



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Embriogénesis somática del coco
(*Cocos nucifera*) a partir de segmentos
embrionarios.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MIGUEL RAMÍREZ MARTÍNEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. MARÍA TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL ALUMNO

**Ramírez
Martínez
Miguel
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
409015849**

DATOS DEL JURADO

**Datos del Tutor
M. en C.
Olivera
Flores
María Teresa de Jesús**

Datos del sinodal 1

**Dra.
Herrera
Santoyo
Josefina**

Datos del sinodal 2

**Dra.
García
Campusano
Florencia Tiberia Aucán**

Datos del sinodal 3

**M. en C.
González
Caballero
Octavio**

Datos del sinodal 4

**Dra.
Murguía
Sánchez
Guillermina**

Datos del trabajo escrito

Embriogénesis somática del coco (*Cocos nucifera*) a partir de segmentos embrionarios

74pp

2014

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora María Teresa Olivera Flores, a Nayelli Meza González, Nayeli García Lozano, a María de Jesús Jiménez Villalobos y a Víctor López por su apoyo durante el desarrollo integro de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por la experiencia y la formación de primera calidad que ahora es parte integral de mí.

Y sobre todo gracias a mis padres y hermanas por su apoyo incondicional.

Cuando sientas que tu esfuerzo, creatividad y pasión dirigidos a generar un cambio que haga de este un mundo mejor, más libre, justo y cooperativo, parezca ser como una gota en un océano infinito.

Piensa ..¿Qué es un océano si no la suma de pequeñas gotas?



TABLA DE CONTENIDOS

	Página
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ANTECEDENTES	9
1. <i>Cocos nucifera</i> L.	9
1.1 Clasificación taxonómica del coco	9
1.2 Descripción de la especie	10
1.3 Distribución	13
1.4 Importancia económica y usos	14
1.5 Cultivo	14
1.5.1 Situación mundial del cultivo de coco	15
1.5.2 El cultivo del coco en México, problemas y retos	17
1.5.3 Producción de coco en México	18
1.5.4 Principales problemas que enfrenta la producción de coco en México	19
1.5.5 Expectativas futuras de la producción del coco	20
2. Cultivo de tejidos vegetales (CTV)	21
2.1 Aspectos generales	21
2.2 Reguladores de crecimiento	21
2.3 CTV como alternativa de micropropagación a partir de embriones somáticos	22
2.4 Oxidación <i>in vitro</i>	23
2.4.1 Factores que favorecen la oxidación	23
2.4.2 Estrategias de control de la oxidación	24
3. Embriogénesis somática	24
3.1 Regulación morfogénica de la embriogénesis somática	26
3.2 Estudio estructural de la embriogénesis somática	27
3.2.1 Técnicas y proceso	28
4. Embriogénesis somática en <i>Cocos nucifera</i> L.	29
4.1 Estudios relevantes	29
4.2 Estudios estructurales de embriogénesis cigótica y somática en coco	30
JUSTIFICACIÓN	36
OBJETIVOS: GENERALES Y PARTICULARES	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
ETAPA I: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE COCO	39

1. Aislamiento de embriones cigóticos maduros	39
2. Desinfección y disección de embriones cigóticos maduros	40
3. Inducción de callo embriogénico de coco.	42
ETAPA II: ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EMBRIONES SOMÁTICOS	45
RESULTADOS	47
ETAPA I: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE COCO	47
1. Aislamiento de embriones cigóticos maduros	47
2. Desinfección y disección de embriones cigóticos maduros.	47
3. Inducción de callo embriogénico de coco.	48
ETAPA II: ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EMBRIONES SOMÁTICOS	52
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4 –diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA (IAA)	Ácido indol-3-acético
AIB (IBA)	Ácido indol-3-butírico
ARN	Ácido ribonucleico
BAP (BA)	6-bencilaminopurina
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
EDTA	Ácido etilendiamina tetra-acético
FAO	Organización para la agricultura y alimentación (Food and Agriculture Organization)
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).
NOM	Norma Oficial Mexicana
PVP	Polivinilpirrolidona
Y3	Medio de cultivo de Eeuwens (1976).
% FC	Porcentaje de formación de callo
% N	Porcentaje de necrosis

RESUMEN

El coco (*Cocos nucifera* L.) es conocido como el “árbol de la vida” ya que provee de ingresos y subsistencia a muchas comunidades costeras. Muchas de las plantaciones del mundo y específicamente en México requieren ser renovadas debido a la senescencia, baja rentabilidad e infección de plagas, principalmente por el amarillamiento letal, lo que ha traído como consecuencia el abandono de los cultivos.

El desarrollo de un protocolo de micropropagación de especies criollas y resistentes a plagas, puede dotar a los productores de plántulas para renovar sus plantaciones que, al asociarse con otros cultivos promueva biodiversidad y agrosistemas ecológicamente estables que permitan el desarrollo sustentable de las comunidades costeras del país.

El presente trabajo representa un primer acercamiento en la construcción de un protocolo reproducible y rentable para la micropropagación *in vitro* de especies nativas de *C. nucifera* var. Alto del pacífico con características seleccionadas, como resistencia a patógenos o alta productividad. Al efecto, se cultivaron segmentos del eje embrionario de embriones cigóticos maduros en medio de cultivo con sales inorgánicas Y3, enriquecido con compuestos orgánicos, sustancias antioxidantes y 2,4 -D (0.2mgL^{-1}) como fitoregulador. En los primeros 15 días se obtuvo la inducción de callo embriogénico y el desarrollo de embriones somáticos con baja oxidación en los tratamientos con compuestos orgánicos Y3 y Coctel 20 en condiciones de oscuridad.

Se realizaron estudios histológicos de callos embriogénicos provenientes de los mejores tratamientos. Este estudio ayudó a entender mejor el proceso de la embriogénesis en el coco, sus distintos orígenes (unicelular y pluricelular), e identificar la presencia de aberraciones como la falta de desarrollo de meristemos apicales, fusión de embriones y malformaciones que inhiben su germinación.

Como principales resultados, se seleccionaron dos medios de cultivo que presentaban una excelente inducción de callo embriogénico (entre 7 – 15 embriones somáticos), en el primer mes de cultivo con una mínima oxidación. Por otra parte, los cortes histológicos nos permitieron comprender mejor el proceso de la embriogénesis en los medios seleccionados, identificamos malformaciones y aberraciones comunes en los embriones somáticos que limitan su desarrollo y germinación.

ANTECEDENTES

1. *Cocos nucifera* L.

Cocos nucifera L., conocido comúnmente como coco, palma de coco o cocotero, es históricamente uno de los árboles mejor reconocidos de los Trópicos, uno de los más cultivados en el mundo e importantes económicamente (Figura 1) (Parrotta, 1993). El coco al proveer de casi todas las necesidades vitales como comida, bebida, aceite, medicina, leña, techo, fibras, utensilios domésticos entre otros, es considerado por muchas regiones como el “árbol de la vida” (Chan y Elevitch, 2006).



Figura 1. Palma de coco. *Ramírez M. 2010.*

Dentro de los problemas que enfrenta este cultivo en la actualidad en nuestro país y en el mundo, es la senescencia de los cultivos, así como enfermedades letales como el amarillamiento letal y *Phytophthora* (Chan *et al.*, 1998).

1.1 Clasificación taxonómica del coco (Universidad Autónoma de Chapingo, 2002)

El cocotero es un árbol perennifolio, que crece preferentemente en las zonas costeras. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae
Subreino: Embriophyta
División: Spermatophyta
Clase: Angiosperma
Subclase: Monocotiledoneae
Orden: Espadicifloras
Familia: Palmaceas
Género: *Cocos*

Especie: *Cocos nucifera*

N. común: Cocotero

Fruto: Coco

1.2 Descripción de la especie

Variedades

Existen dos variedades distintas de cocotero de acuerdo a su tamaño, estatura de la palma y el tipo de reproducción, los Altos y los Enanos. Los Altos son la variedad más conocida en el mundo, esta variedad es de polinización cruzada (alogamas) y por ese motivo tiene una alta variabilidad, la cual se observa en una amplia gama de características tales como el tamaño, forma y color de la fruta así como también la composición de la fruta (grosor del mesocarpo, peso del endospermo), y cosecha. Por otro lado las variedades Enanas, presentan autopolinización (autogamas) y por lo tanto son genéticamente más homogéneos, lo cual se ve reflejado en la apariencia de los diferentes tipos de Enanos (Chan y Elevitch, 2006).

Raíz

El sistema radicular es fasciculado (dispuestas en manojo, todas del mismo tamaño). Las raíces primarias son las encargadas de la fijación de la planta y de la absorción de agua. Las terciarias (aquéllas derivadas de las secundarias) son las verdaderas extractoras de nutrientes (Parrotta, 1993; Domínguez *et al.*, 1999; Alfonso y Ramírez, 2008).

Tallo

El tronco del cocotero es un espite de forma cilíndrica no ramificado. Generalmente es recto o inclinado, muestra en toda su longitud cicatrices de las hojas que han ido cayendo. El ápice presenta un grupo de hojas en forma de penacho, que protegen el único punto de crecimiento que posee la planta (Alfonso y Ramírez, 2008).

El troco no posee tejido meristemático, así que éste no engrosa, sin embargo, las variaciones en la disponibilidad de agua y nutrientes inducen cambios en el diámetro del tronco. La altura de la especie depende principalmente de condiciones ambientales y de la variedad (Parrotta, 1993; Alfonso y Ramírez, 2008).

Hojas

La plántula desarrolla de cuatro a cinco hojas-escama o vainas foliares, posteriormente de dos a seis hojas plegadas y finalmente las hojas pinnadas típicas de los árboles maduros. (Parrotta, 1993). El largo de la hoja puede alcanzar los seis metros y es menor al aumentar la edad de la planta. En las variedades Altas, la hoja puede pesar entre diez y doce kilogramos. En condiciones ambientales favorables una planta adulta de los cocotereros

Altos emite de doce a catorce hojas por año, en cambio el cocotero Enano puede emitir hasta dieciocho hojas en el mismo período. La copa presenta generalmente entre 25 y 30 hojas (Santos-Ferreira *et al.*, 1998).

Flores

La floración ocurre durante todo el año y continúa hasta que el árbol alcanza una altura de 25 a 30 m, cuando la reducción y el tamaño de las frutas comienzan a declinar, usualmente a los 60 años de edad (Corner, 1966; Opeke, 1982). El cocotero posee inflorescencias paniculadas, axilares, protegidas por una bráctea llamada espada. La espada se desarrolla en 3 ó 4 meses, después se abre y libera las espigas. Cada espiga posee flores masculinas en los dos tercios terminales y femeninas en el tercio basal (Figura 2) (Parrotta, 1993; Domínguez *et al.*, 1999; Alfonso y Ramírez, 2008).

Las flores femeninas, son globulosas, rodeadas de brácteas, de alrededor de 25 mm de diámetro, tres sépalos redondos cóncavos e imbricados, tres sépalos pequeños, estilo corto con tres estigmas, tres óvulos normalmente sólo uno fértil (Parrotta, 1993). En cuanto a las flores masculinas, por lo general miden ocho milímetros de largo. Tienen tres sépalos y seis estambres. Las flores masculinas son de vida más corta que las femeninas (Parrotta, 1993).

En los cocoteros Altos o alógamas, las flores masculinas se abren antes que las femeninas estén receptivas, induciendo así la polinización cruzada. En el caso de los Enanos o autógamas la apertura es simultánea, por tanto hay un porcentaje alto de autofecundación. La polinización en el coco es predominantemente cruzada (Henderson, 1988). Los agentes polinizadores principales son el viento y los insectos, específicamente las abejas, avispas, escarabajos, hormigas y moscas (Opeke, 1982).



Figura 2. Inflorescencias del cocotero (Chan y Elevitch, 2006).

Frutos

La fruta del cocotero es una drupa fibrosa que consiste de afuera hacia adentro en: una piel dura, delgada y brillante (exocarpo), una capa fibrosa gruesa (mesocarpo), una capa delgada y muy dura (endocarpo), el endospermo sólido y una amplia cavidad llena con endospermo líquido (Chan y Elevitch, 2006) (Figura 3).

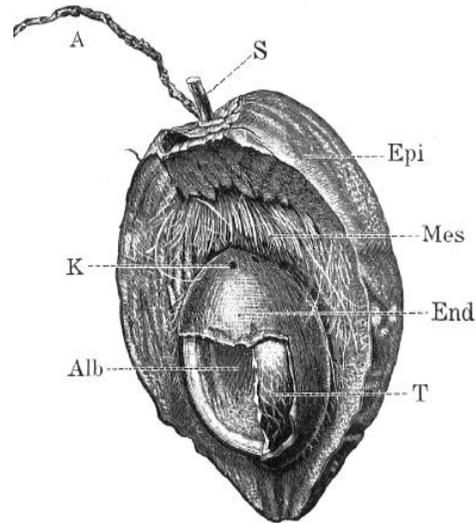


Figura 3. Corte del coco. A) Eje superior con cicatrices de flores masculinas S) Pedúnculo Epi) Epicarpio. Mes) Mesocarpo. End) Endocarpo. T) Testa adherida al endospermo sólido. Alb) Endospermo sólido rodeando la cavidad de la nuez. K) Micrópilo de germinación. (Winston, 1901).

Cuando el fruto está inmaduro, el exocarpo es normalmente verde y a veces hasta colores bronce, aunque dependiendo de la variedad específica de coco, las frutas maduras varían en color de verde a amarillo ocre y rojo naranja, pero se secan en el árbol y presentan un color pardo opaco antes de caer (Parrotta, 1993). Hay una amplia variación en la forma y color de los frutos de acuerdo a las variedades y a las poblaciones. La forma de las frutas va de elongadas hasta esféricas y el peso desde 850 hasta 3700 gramos (Figura 4) (Chan y Elevitch, 2006). Desde la polinización hasta la maduración de la fruta transcurren aproximadamente doce meses (Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006).



Figura 4. Diversidad de frutos en *Cocos nucifera*. (Chan y Elevitch, 2006).

La semilla del cocotero es en si la concha esférica del endocarpo, la cual cuenta con tres micrópilos, el más suave de los tres indica la posición del embrión viable, el cual está cubierto por endospermo sólido (Chan y Elevitch. 2006). Las semillas del cocotero no poseen una etapa inactiva ya que las plántulas a veces comienzan a germinar cuando todavía están en el árbol (Parrotta, 1993). Sin embargo, en general, transcurren cuatro meses (aproximadamente dieciséis meses después de la polinización) desde la caída de la fruta madura hasta la emergencia de la plántula bajo condiciones naturales (Parrotta, 1993; Chan y Elevitch. 2006).

1.3 Distribución

El área de distribución natural del coco no se conoce con certeza, aunque muchos botánicos creen que se originó dentro de la región Indomalaya en el Pacífico Occidental (Figura. 5) (Parrotta, 1993). Su hábitat natural era solamente costas arenosas, sin embargo, actualmente se le encuentra en una amplia gama de suelos. El coco no es una planta invasiva, ya que sólo prospera en ambientes cálidos y húmedos, sin embargo actualmente se le encuentra en áreas continentales, principalmente por dispersión del ser humano (antrópica) (Chan y Elevitch. 2006). Esta teoría de que el coco es de origen insular asiático-pacífico y no de origen tropical americano, se basa en tres principales evidencias: 1) Su alto grado de diversidad genética en la región asiática-pacífica relativo a la América tropical; 2) La presencia de fauna (mamíferos e insectos) estrechamente asociados con el coco en Melanesia (Corner, 1966; Opeke, 1982); y 3) El descubrimiento de fruta fósil del Mioceno de *C. Zeylandia* en Nueva Zelanda, restos fósiles de *C. nucifera* en Nueva Guinea de más de 4,000 años de edad y restos fósiles en Vanuatu de más de 5,000 años de edad (Buckley y Harries, 1984).

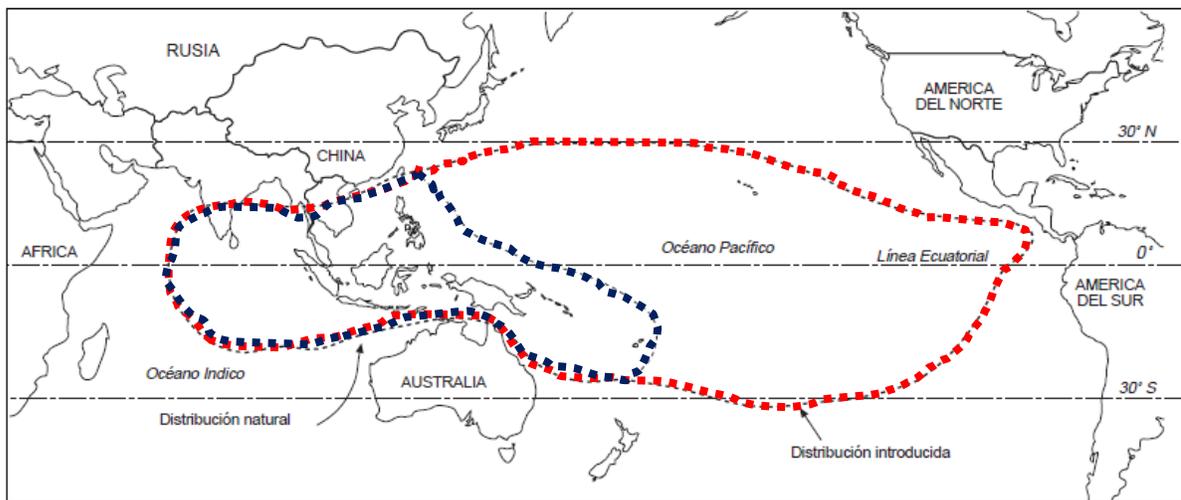


Figura 5. Distribución natural y pre-colombina artificial del coco, *Cocos nucifera*. La región interna de menor tamaño (Azul) representa el área de origen aparente; la región externa de mayor tamaño (Rojo) representa la distribución artificial antes de 1500 D.C. (Parrotta, 1993)

El coco se ha cultivado y usado en la India y en el Asia continental del sudeste por más de 3,000 años (Corner, 1966). Antes de las colonizaciones europeas en el Nuevo Mundo, el

coco ya había colonizado sitios insulares y de tierra firme a lo largo de la costa pacífica de la América Central (Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006). Temprano en los períodos coloniales españoles y portugueses el coco se introdujo en el Caribe, el noreste de la América del Sur y en Brasil (Corner, 1966).

Hoy en día, el coco tiene una distribución entre los trópicos (pantropical) y crece en sitios apropiados entre las latitudes 26° N y 26° S. Los límites del extremo norte y sur de su área de distribución introducida incluyen la Florida, el norte de la India y Madagascar, aunque el crecimiento en estas áreas no es lo suficientemente robusto como para impartir un valor industrial a la especie (Parrotta, 1993). Las regiones mundiales productoras de coco más importantes son el archipiélago Malayo, los países del sudeste del Asia, la India, Sri Lanka, las islas del Pacífico, África del este y países de la América Central y del Sur (Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006).

1.4 Importancia económica y usos

Los usos del cocotero son realmente muy amplios, se utiliza absolutamente toda la planta, provee para todas las necesidades humanas y en ello radica su importancia económica. Solamente en México existen más de 100 productos que se elaboran a partir de la palma de coco, estos van desde simples utensilios de uso local u ornamental, hasta productos con un alto valor agregado. Dentro de los productos comerciales más importantes encontramos: la fibra del fruto, el carbón de la concha, la copra, el aceite, el coco deshidratado y la leche de coco (Granados y López, 2002; Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006).

Por otro lado, la importancia del cultivo de coco no sólo es por el valor de la copra y los productos motor de la economía de muchos países (Granados y López, 2002; Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006), sino también por el atractivo turístico que ejerce como símbolo de trópico y relacionado al turismo convencional, sostén económico para miles de trabajadores y por las numerosas actividades en su industrialización, consumo en fresco y como artesanías (Granados y López, 2002).

1.5 Cultivo

El cultivo de coco prospera principalmente en el trópico húmedo entre los 20° latitud norte y 20° latitud sur, en costas arenosas a altitudes por debajo de los 1000 msnm, en un intervalo de temperatura media de 25 a 30 ° C (Granados y López, 2002; Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006; Universidad Autónoma de Chapingo, 2002). El coco también requiere de un buen drenaje, comúnmente se encuentra en las costas arenosas en condiciones de alta humedad distribuida equitativamente a través del año, con una precipitación pluvial mínima de 1500 mm anuales o bien en áreas con mucha menor precipitación siempre y cuando el agua de los mantos freáticos esté disponible (Parrotta, 1993; Granados y López, 2002; Chan y Elevitch, 2006). El cocotero es una planta cuyo metabolismo y crecimiento son mayores durante las horas de mayor insolación o con una

insolación más prolongada (heliófila), por lo que no puede crecer en condiciones de sombreado, requiere un mínimo de 120 horas de luz solar directa al mes. La radiación solar es especialmente importante en las épocas de crecimiento, ya que si no reciben la luz de manera directa las plantas crecen con malformaciones y débiles (Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006). Otro factor importante para el cultivo del cocotero son los vientos constantes, ya que no solo es agente polinizador sino que también es necesario para la traspiración de la planta que a su vez estimula la absorción y circulación de nutrientes (Parrotta, 1993; Chan y Elevitch, 2006).

Para fines de producción comercial las plantas silvestres todavía aportan una parte importante, aunque las plantaciones de coco son más comunes. Para las plantaciones se utilizan semillas maduras, las cuales primero se mantienen en viveros o semillero y al cabo de un par de meses germinan y en un año se trasplantan en su lugar definitivo (Granados y López, 2002).

Actualmente se lleva a cabo una selección de individuos para mejorar la producción. La productividad de la palma de coco oscila entre 1000 y 1400 kilogramos de copra por hectárea, aunque en cultivos comerciales, con material genéticamente seleccionado y mayores cuidados se suele obtener un mayor rendimiento aproximadamente entre 2700 y 4000 Kg de copra por hectárea (Granados y López, 2002).

1.5.1 Situación mundial del cultivo de coco.

De acuerdo a cifras proporcionadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), en el mundo se cultivan 11, 715,502 hectáreas y se cosechan 62,451, 506 toneladas de coco. Son importantes en superficie y producción de este cultivo, Filipinas, Indonesia e India, que en conjunto aportan el 75.28% de la producción y el 72.05% de la superficie (Cuadro 1) (FAOSTAT, 2010). Actualmente un total de 92 países son productores de coco, entre los que destacan los países Asiáticos miembros del APCC (Asia and Pacific Coconut Community) los cuales para el 2010 generaron alrededor del 90% del total de la producción (FAOSTAT, 2010; APCC, 2010).

Cuadro 1. Superficie, producción y rendimiento del cocotero 2010 (FAOSTAT, 2010).

País	Superficie		Producción		Rendimiento
	Has	%	Toneladas	%	Hg/ha
Indonesia	3,080,700	26.30	20,655,400	33.07	6.705
Filipinas	3,464,850	29.57	15,540,000	24.88	4.485
India	1,895,000	16.18	10,824,100	17.33	5.712
Brasil	264,323	2.26	2,705,860	4.33	10.237
Sri Lanka	393,200	3.36	2,238,800	3.58	5.694

Tailandia	230,950	1.97	1,298,150	2.08	5.621
Vietnam	123,070	1.05	1,179,900	1.89	9.587
México	149,400	1.28	983,000	1.57	6.580
Papúa New Guinea	220,000	1.88	902,000	1.44	4.100
Malasia	110,000	0.94	527,622	0.84	4.797
Resto del Mundo	4,974,709	42.46	26,779,696	42.88	5.383
Total	11,715,502	100	62,451,506	100	49,970

En la figura 6 se muestra una gráfica con los principales países productores de coco, en el cual aparece Indonesia como el primer productor a nivel mundial al participar con el 33.07% del total de la producción mundial.

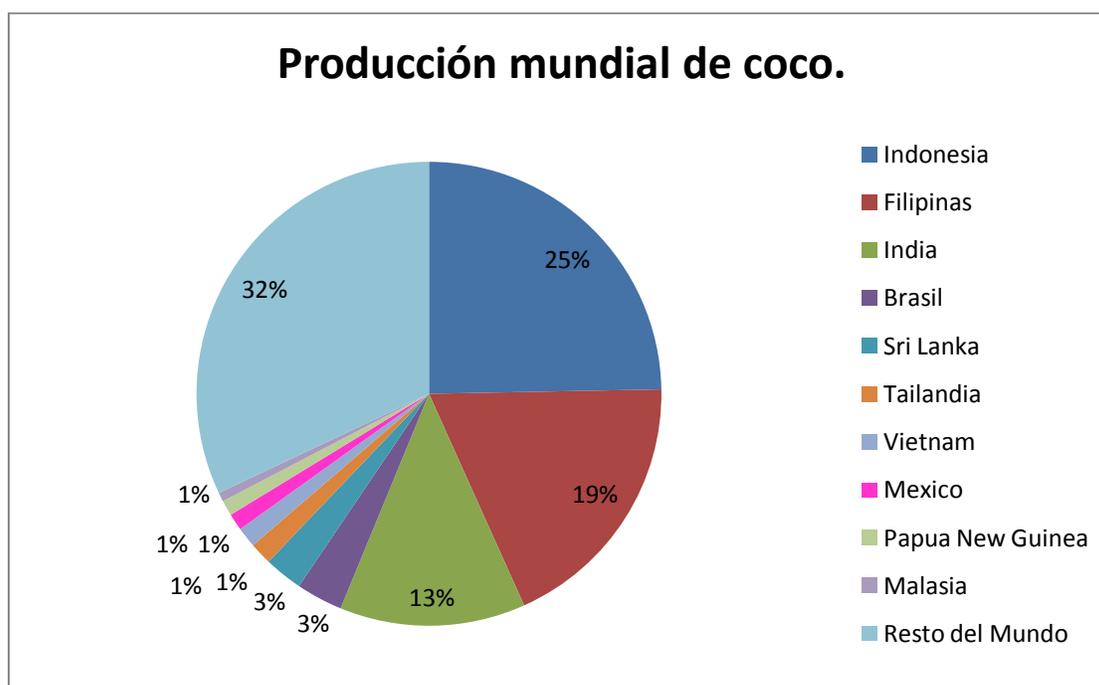


Figura 6. Producción mundial de coco (FAOSTAT, 2010).

En lo referente al cultivo y producción del cocotero en América Latina, se observa que son básicamente Brasil y México los países que sobresalen en cuanto a volumen de la producción se refiere, los cuales en el 2010 participaron con el 4.33% y 1.57% de la producción respectivamente, ubicándose como el cuarto y octavo productor a nivel mundial, sin embargo si se comparan dichos volúmenes de producción con los tres grandes productores, es poco significativo (FAOSTAT, 2010).

Es importante mencionar que Brasil es el país que ha logrado mayor crecimiento y rendimiento en producción ha logrado en la últimas dos décadas, caso opuesto es el de

México, que para el mismo período ha registrado un decrecimiento serio, el más bajo de los diez principales países productores (SAGARPA, 2005). Para el caso de Brasil su crecimiento se explica por la fuerte demanda del consumo, mientras que en México la caída expresa una reconversión productiva, al pasar de la producción copra (la cual actualmente presenta estancamiento en los precios) a otros cultivos de mayor valor como las hortalizas y algunos frutos, así como por enfermedades como el amarillamiento letal (SAGARPA, 2005; Chapingo, 2002; Granados y López, 2002).

En términos generales se puede decir que la producción mundial del cocotero en la última década ha enfrentado un estancamiento al presentar una tasa tanto de crecimiento como de rendimiento muy bajas, tasas que constatan el efecto de la producción sobre la caída de los precios internacionales, tanto del coco como de sus derivados (SAGARPA, 2005). Esta caída se debe principalmente a la aparición de sustitutos del aceite de coco a precios más competitivos así como el estancamiento tecnológico, ya que los países productores de coco aun realizan un manejo artesanal de los cultivos (SAGARPA, 2005; Universidad Autónoma de Chapingo, 2002). La falta de inversión, tecnificación e investigación propicia la pobreza de los productores e impide el desarrollo sustentable del cultivo.

1.5.2 El cultivo del coco en México, problemas y retos.

El cultivo comercial de coco en México data de más de 100 años. Su evolución puede dividirse en tres periodos: el primero que comprende de 1927-1945. donde se comercializaba solamente como fruta a nivel regional, el segundo donde de 1945 -1968, donde la producción de coco a nivel nacional tuvo un auge y fue motor económico de las zonas costeras del país, caracterizándose principalmente por un incremento acelerado en producción de copra y aceite. Estos últimos resultados datan de la segunda guerra mundial, en donde se ve reflejada la invasión de las tropas japonesas a los principales países productores (SAGARPA, 2005; Universidad Autónoma de Chapingo, 2002).

Por último un tercer periodo donde se presenta un estancamiento y posteriormente un declive productivo, sobre todo en la década de los 90's, la cual se atribuye a numerosas causas. En particular debe mencionarse que la estructura productiva del cocotero ha estado orientada casi en su totalidad a la producción de copra y la cual al abrirse el país a los mercados internacionales fue afectada seriamente, debido a la importación de diversos aceites de plantas oleaginosas y grasas vegetales (SAGARPA, 2005). Esto significó una caída de precio del aceite de coco y la copra. En consecuencia, en los 80's y de manera más acelerada durante los 90's, se presentó un proceso de sustitución de palmares por frutales y hortalizas. Por otra parte, el bajo precio y los crecientes costos de manejo disminuyeron el rendimiento y la rentabilidad del cultivo de coco, con lo cual se descuidó la replantación, generando que actualmente se tengan palmares viejos y bajos rendimientos (SAGARPA, 2005).

1.5.3 Producción del coco en México.

Según el Sistema de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), el cultivo de coco en México comprende más del 130,000 hectáreas distribuidas en nueve estados (Cuadro 2) (SIAP, 2011). El principal producto es la copra y se ubica principalmente en el estado de Guerrero, ya que contribuye con el 77% de la producción nacional (Figura 7) (SIAP, 2011). Anualmente se producen más de 200,000 toneladas de copra, las cuales se procesan y se obtiene aproximadamente 120,000 toneladas de aceite (SIAP, 2011).

En el 2002 el 10% de la producción se empleaba como fruta principalmente para la fabricación de dulces y el 90 % restante se dedicaba a la copra de la que se extrae entre 60 y 70 % de aceite. El aceite extraído se utiliza en su mayoría para la fabricación de jabones y una pequeña parte para fines alimentarios especialmente para la industria galletera (Granados y López, 2002; Chapingo, 2002; SAGARPA, 2005).

Cuadro 2. Superficie, producción y rendimiento de la compra en México. (SIAP, 2011).

Ubicación	Sup. Sembrada	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
	(Ha)	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
CHIAPAS	905	905	903	1	4,542.74	4,102.10
COLIMA	16,619.50	16,539.50	25,933.25	1.57	5,508.39	142,850.54
GUERRERO	84,862.00	84,862.00	166,339.43	1.96	5,798.31	964,488.22
JALISCO	1,208.00	1,208.00	1,295.02	1.07	5,771.86	7,474.67
MICHOACAN	2,934.00	2,904.00	2,431.17	0.84	7,074.29	17,198.81
OAXACA	10,135.00	10,135.00	9,552.84	0.94	2,826.31	26,999.26
TABASCO	12,474.84	12,473.84	8,733.93	0.7	6,877.16	60,064.66
VERACRUZ	1,513.00	1,400.00	878.5	0.63	2,300.00	2,020.55
Total	130,811.34	130,427.34	216,067.14	1.66	5,670.45	1,225,198.81

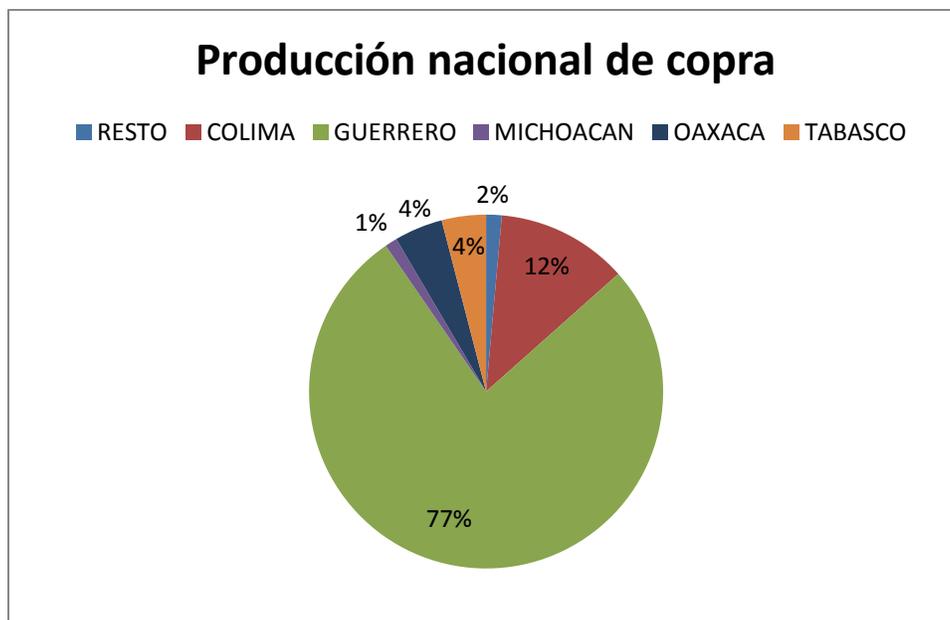


Figura 7. Producción nacional de copra (SIAP, 2011).

La producción de coco se destina casi en su totalidad para el consumo nacional sin satisfacer la demanda, por lo que ha sido necesaria la importación (SAGARPA, 2005). Por lo anterior, es importante resaltar el potencial que tiene este cultivo en México ya que es de gran importancia para la economía de las zonas costeras del país y si se sembrara por lo menos el 50% de la superficie potencial de cultivo se cubriría la demanda nacional y habría excedentes para la exportación (Granados y López, 2002), además de generar ambientes propicios para el turismo, la biodiversidad y protección contra huracanes y tormentas tropicales.

1.5.4 Principales problemas que enfrenta la producción de coco en México

Actualmente la principal problemática del cultivo de cocotero es la poca rentabilidad del cultivo, ya que el precio de la copra es muy bajo y requiere elevados costos de producción incluyendo los costos de mantenimiento y control de plagas. Por otro lado se requieren de grandes extensiones de tierra cultivada (más de 30 hectáreas) para que una familia nuclear pueda vivir de este cultivo (Granados y López, 2002).

Sumado a lo anterior, existe un fuerte atraso tecnológico en los procesos de producción y cultivo, ya que a los cultivos se les da un manejo mínimo y rudimentario (Granados y López, 2002). Además la mayoría de los palmares tiene una baja productividad debido al envejecimiento por lo que se hace necesario la renovación de plantaciones viejas. Se estima que más del 30% de las plantaciones del país son viejas y prácticamente improductivas (Universidad Autónoma de Chapingo, 2002).

Por ello, la problemática del cultivo de coco es muy compleja y se le agrega un componente de mucho mayor peso: las plagas y enfermedades. Dentro de este aspecto se

destaca el daño causado por el ácaro *Eriophyes guerreronis* K. y el del Mayate o Picudo *Rynchophonus palmanum* L. y recientemente el amarillamiento letal del cocotero, el cual ha tenido un gran impacto en las últimas décadas debido a su alta virulencia y falta de control fitosanitario (Granados y López, 2002).

El amarillamiento letal es una enfermedad devastadora que ataca las plantaciones de coco. Esta enfermedad es producida por un micoplasma y es transmitida por el insecto chupador *Myndus crudus* (Figura 8), cuando éste se alimenta de la savia del floema de las palmeras. Su detección es muy difícil, ya que entre la adquisición del patógeno y la aparición de los primeros síntomas transcurren de siete a quince meses y entre el primer síntoma y la muerte de la palma de tres a seis meses (Granados y López, 2002).



Figura 8. A la izquierda, Palmares muertas consecuencias del amarillamiento letal en costas mexicanas (Diario la opinión, 2012). A la derecha *Myndus Crudus*, vector del amarillamiento letal (University of California Photo Data Base, 2012).

El amarillamiento letal apareció en México a finales de los años 70 's y se ha extendido a todo el Caribe. Al no contarse con métodos de control eficientes, hasta 1998, provocó la pérdida de alrededor de 650 mil palmeras y ubicadas solamente los estados de Quintana Roo, Yucatán, Campeche y Tabasco. Actualmente solamente en Veracruz, se han devastado el 90 % de los palmares (Diario La opinión, 2012), y se ha comprobado que el patógeno se ha dispersado a todos los estados productores de copra en el país, provocando grandes pérdidas económicas y ambientales (Pagina Web oficial del Gobierno del estado de Guerrero, 2012 ; CONACOCO, 2012). Actualmente la investigación para el control de esta enfermedad, se basa principalmente en el desarrollo de genotipos resistentes con altos rendimientos y adaptabilidad ambiental (Granados y López, 2002; Chang *et al.*, 1998; NOM-015-FITO-1995).

1.5.5 Expectativas futuras de la producción del coco en México.

Dentro de las expectativas que se tiene sobre la producción de coco en nuestro país, es la organización local y nacional de los productores para ser objeto de apoyos financieros para la producción, industrialización y comercialización (Chapingo, 2002; SAGARPA, 2005).

Por otro lado, está la investigación enfocada en la agroecología, fitopatología, epidemiología y etiología. Así como en genética orientada a la selección, evaluación y obtención de material resistente a plagas y alta productividad (Chapingo, 2002).

Ligado a lo anterior está la tecnificación mediante herramientas biotecnológicas como es el cultivo de tejidos vegetales y biorreactores, de manera que se obtenga una alta producción de material elite (con características de resistencia y alta productividad) a bajo costo (1,000,000 plantas anuales), y sea posible la constante renovación de los plantaciones de cocotero con plantas de alto rendimiento y resistentes a patógenos.

Todo lo anterior construido sobre un modelo de desarrollo sustentable, donde se obtengan productos de alto valor agregado, exista el comercio justo orgánico, promueva el policultivo, favorezca la biodiversidad, el aprovechamiento sustentable y exista una derrama económica que mejore significativamente la calidad de vida de los productores y los habitantes de la región.

2. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).

2.1 Aspectos generales

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta de la biotecnología basada en la característica que presentan la mayoría de las células vegetales para regenerar una planta completa (totipotencialidad) (Roca y Mroginski, 1991). Está conformada por varias técnicas para el cultivo aséptico de órganos, tejidos o células vegetales (explantes) y se le proporcionan condiciones físicas y químicas controladas y apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. (Loyola-Vargas *et al.*, 2008; Roca y Mroginski, 1991). El cultivo de tejidos vegetales explora condiciones que promueven la división celular y reprogramación genética en condiciones *in vitro* y es considerado una herramienta importante tanto para la ciencia básica como para estudios aplicados, así como también en proyectos comerciales (Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

Actualmente, las instalaciones y laboratorios para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se utilizan para diversos propósitos, ya que el cultivo *in vitro* se ha tornado en un eje básico de la biotecnología moderna. Hoy en día hay cinco áreas principales donde el cultivo de tejidos se aplica y pueden ser reconocidas como: sistema modelo para estudio de fisiología vegetal básica, para la generación de organismos genéticamente modificados fértiles, preservación de especies en peligro de extinción, ingeniería metabólica de químicos finos y propagación a gran escala de materiales elite (Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

2.2 Reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento, son compuestos químicos naturales o sintéticos que funcionan como mensajeros y respuestas químicas. En las plantas superiores, estos

compuestos regulan la función, coordinan el metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis del organismo (Taiz y Zeiger, 2010)

El desarrollo de la herramienta biotecnológica del cultivo de tejidos vegetales, fue gracias al descubrimiento de los reguladores de crecimiento, que en su momento se definieron como sustancias orgánicas que se sintetizan en pequeñas cantidades en alguna parte de la planta y que actúan en otra. El crecimiento y desarrollo de las plantas es posible gracias a un control homeostático entre estas sustancias, las cuales se han clasificado como promotores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) y las inhibidoras de crecimiento (ácido abscísico y jazmonatos) (Martinez M., 2010).

Los primeros grupos de reguladores que se descubrieron son: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y el etileno. Sin embargo, en los últimos años, se han descubierto otros compuestos que de la misma manera tienen un rol regulador en el desarrollo de las plantas como los brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y jazmonatos (Taiz y Zeiger, 2010)

2.3 CTV como alternativa de micropropagación a partir de embriones somáticos

Debido a la problemática antes mencionada y al incremento de la demanda de productos y subproductos de coco es necesario el establecimiento de un protocolo de micropropagación reproducible y rentable para individuos selectos de palma de coco. En este trabajo se da mayor importancia a esta última área aplicada del cultivo de tejidos vegetales, propagación a gran escala de materiales elite o micropropagación.

La micropropagación se define básicamente como la multiplicación masiva *in vitro* (Roca y Mroginski, 1991). En la actualidad la micropropagación tiene un amplio aplicación a nivel comercial para la propagación de plantas, mayormente ornamentales y medicinales pero también para uso industrial y alimenticias (Loyola-Vargas *et al*, 2008). Las principales ventajas que tiene la micropropagación son: el incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, la reducción del tiempo de multiplicación, la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados, permite un mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilita el transporte del material y por ultimo nos da la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existan pocos individuos (Roca y Mroginski, 1991).

Existen tres maneras de micropropagación reportadas; 1) Incrementando la ruptura en dormancia de las yemas axilares, 2) Produciendo brotes adventicios directa o indirectamente (organogénesis) y 3) Mediante la embriogénesis somática directa o indirecta de los explantes (Loyola-Vargas *et al*, 2008). En la mayoría de los casos, la embriogénesis somática es la mejor opción como sistema de propagación de plantas ya que presenta una serie de ventajas como: Una enorme capacidad de multiplicación

aplicable industrialmente que permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas. Sin embargo, presenta también una serie de problemas, ya que produce anomalías morfológicas, fisiológicas y genéticas en los cultivos, fenómenos de poliembriónía indeseables, falta de maduración y dormancia o germinación prematura de los embriones en cultivo. Además, la técnica no puede aplicarse a gran número de especies, aunque continuamente se obtienen nuevos éxitos con nuevas especies (López y Perán, 1997)

2.4 Oxidación *in vitro*

El cultivo *in vitro* de coco se ha caracterizado como una especie sumamente recalcitrante que presenta fácilmente oxidación y necrosis de los explantes. La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000).

2.4.1 Factores que favorecen la oxidación

Los factores que causan y favorecen la oxidación de los tejidos vegetales *in vitro* son radicales libres que se producen por el metabolismo de oxígeno en los tejidos, conocidos como especies de oxígeno reactivo (ROS). Estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O₂ para formar el oxígeno singulete (¹O₂) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O₂ para formar el radical súper óxido (O²⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o el radical hidroxilo (HO[·]) respectivamente. En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la β- oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Bray *et al.*, 2000, Azofeifa, 2009). Los ROS también se pueden generar en otros organelos celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes (Karp, 1998).

Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray *et al.*, 2000, Pompeu *et al.*, 2008). En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George, 1993, Tabiyeh *et al.*, 2006, Van Staden *et al.*, 2006, Abdelwahd *et al.*, 2008).

2.4.2 Estrategias de control de la oxidación.

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro*, son numerosas. Para empezar, la prevención de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento. Cuando el estrés oxidativo no se logra evitar, se puede recurrir a una serie de medidas prácticas. En la Cuadro 3, se presenta un resumen de las estrategias generales más comunes (Azofeifa, 2009).

Para algunas especies los investigadores resolvieron el problema con la utilización de una sola estrategia. Por ejemplo, uso de medio líquido (Zepeda y Sagawa, 1981), cambio del agente gelificante (Finch *et al.*, 1992), uso de carbón activado (Harikrishnan *et al.*, 1997), de polivinilpirrolidona o la sustitución del regulador de crecimiento (Jambor-Benczur *et al.*, 1997). Desafortunadamente, un único método no siempre es suficiente debido a la complejidad del problema, requiriéndose una solución integral que involucre un mayor número de variantes. En este sentido, Thomas y Ravindra (1997) mencionan que en el cultivo *in vitro* de ápices de *Mangifera indica*, la oxidación de tejidos y la exudación de fenoles, estuvieron interrelacionadas e influenciadas por un número de factores que incluyeron al genotipo, tipo y época de escisión del explante, tratamiento de desinfección y medio de cultivo.

Cuadro 3. Estrategias de control de oxidación *in vitro* (Azofeifa, 2009).

Estrategias para el control de la oxidación <i>in vitro</i>.
Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
Crecimiento del explante a baja luminosidad y oscuridad.
Crecimiento del explante en una temperatura baja.
Subcultivos frecuentes.
Cultivo en medio líquido.
Uso de adsorbentes, en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo como el carbón activado
Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo como el ácido cítrico y ácido ascórbico
Elección de los reguladores de crecimiento
Elección del medio de cultivo

3. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática en términos generales es un proceso de desarrollo por el cual células somáticas, bajo las condiciones de inducción adecuadas, sufren reestructuración genética y generan células embriogénicas. Estas células sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la formación primero de estructuras proembrionarias o pseudoembrionarias que posteriormente dan origen a estructuras

globulares y finalmente a los embriones somáticos, que si logran un buen desarrollo pueden generar plantas nuevas. La embriogénesis somática recuerda a embriones cigóticos, debido a que experimentan casi los mismos estadios de desarrollo (Figura 9) (Yang y Zhang, 2010).

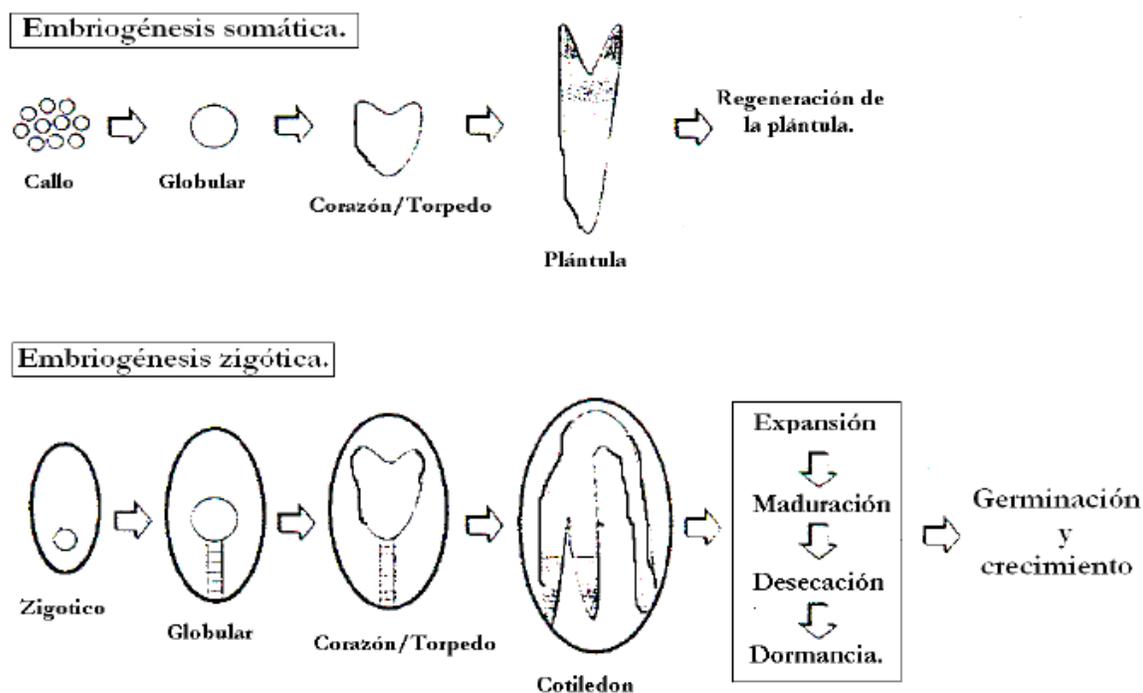


Figura 9. Comparación entre embriogénesis somática y cigótica, donde se observan similitudes en el proceso principalmente en el estadio globular y corazón / torpedo (Arnold *et al.*, 2002).

El proceso de la embriogénesis somática se puede dividir en cuatro estadios (Muñoz, 2003; Merckle *et al.*, 1995):

1. Desarrollo: Cuando las células se están diferenciando; también se le conoce como estadio temprano, proembrionario o preglobular, se caracteriza por un alto contenido de citoplasma denso y ausencia general de vacuolización (Muñoz, 2003).
2. Proliferación: Para lograr la proliferación de las células embriogénicas normalmente se emplean auxinas y citocininas para estimular la multiplicación de embriones (Merckle *et al.* 1995)
3. Maduración: la maduración es el periodo donde el embrión somático se expande y acumula sustancias de reserva. En esta etapa es fundamental la presencia de nitrógeno reducido en el medio como nitratos, aminoácidos y caseína hidrolizada. Por otro lado, los carbohidratos así como concentraciones bajas de oxígeno, son necesarias para promover la maduración y evitar la germinación precoz (Muñoz, 2003; Merckle *et al.*, 1995).

4. Germinación: durante este estadio, los embriones maduros son transferidos a medios con bajas concentraciones o nulas de auxinas para promover el desarrollo meristemático de brotes y raíces (Merckle *et al.*,1995)

3.1 Regulación morfogénica de la embriogénesis somática

En el último siglo se ha estudiado intensamente la embriogénesis somática y se han logrado avances en la descripción morfológica y anatómica, aunque aún no se sabe mucho del proceso esencial de progresión de células somáticas a la morfogénesis embrionaria (Yang y Zhang, 2010).

Lo que se sabe es que la embriogénesis somática involucra diferentes células somáticas, las cuales llegan a adquirir la capacidad embriogénica y de esta forma las células proliferan como células embriogénicas. La iniciación de este proceso está restringida a ciertas células predeterminadas, las cuales tienen la capacidad de activar genes involucrados en la generación de células embriogénicas. Una vez que estos genes se activan, cambia el patrón de expresión genética en el tejido por un programa de expresión de genes embriogénicos. Un paso clave para la inducción de la embriogénesis somática, es la modulación de factores físicos y químicos específicos que cambian la vía de desarrollo. Algunos autores han propuesto que los reguladores de crecimiento y el estrés tienen un papel crucial en la cascada de señales de transducción para una reprogramación de la expresión genética, seguida de una serie de divisiones celulares que puede inducir tanto a un callo desorganizado como a un crecimiento polarizado que lleve a la embriogénesis somática. Las auxinas, son un tipo de hormona que regulan la expresión y reprogramación genética, las cuales favorecen la capacidad embriogénica de las células somáticas (Yang y Zhang, 2010).

Una vez que las células embriogénicas se han formado, continúan proliferando hasta formar masas proembriogénicas. Las auxinas son requeridas para la proliferación de dichas masas proembriogénicas pero son inhibitoras para el desarrollo de embriones somáticos. Los cultivos de embriones somáticos pueden ser subcultivados por periodos largos y pueden mantener su capacidad embriogénica, esto dependerá de la especie y el genotipo, sin embargo en la mayoría de las especies, el potencial embriogénico decrece con el tiempo hasta eventualmente perderse (Yang y Zhang, 2010).

Por otro lado, el nitrógeno también ha sido reconocido como un factor inductor positivo o negativo de la embriogénesis y desarrollo del embrión, dependiendo de la especie (Yang y Zhang, 2010).

Tipos de embriogénesis somática.

La embriogénesis somática puede dividirse en dos tipos: directa e indirecta. La embriogénesis somática directa es aquella que se origina sin que el explante pase por callo mientras que la indirecta pasa por este (Sharp *et al.*, 1980; Yang y Zhang, 2010). En la embriogénesis directa se da un mínimo de proliferación y reprogramación al contrario de la indirecta en donde hay una mayor reprogramación genética para que el callo prolifere con habilidad embriogénica antes de la formación del embrión (Yang y Zhang, 2010). La respuesta del explante hacia embriogénesis directa o indirecta depende principalmente del estado fisiológico del explante, la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento (Yang y Zhang, 2010).

Durante la embriogénesis somática indirecta se presenta tanto callo no embriogénico como embriogénico; el callo embriogénico se distingue por su estructuras nodulares, una superficie lisa en algunas especies y sus células embriogénicas que forman los embriones somáticos, estos son normalmente pequeños y de forma isodiamétrica. Además, estas células tienen un núcleo grande densamente teñido, un denso citoplasma con pequeñas vacuolas y una pared celular gruesa que muestran una gran actividad metabólica. En cambio el callo no embriogénico en general es rugoso, friable y translucido (Jiménez y Bangerth, 2001; Yang y Zhang, 2010).

3.2 Estudio estructural de la embriogénesis somática

Las observaciones histológicas han demostrado ser una herramienta útil para su estudio estructural y del proceso de la embriogénesis somática en diferentes especies, ya que al conocer el desarrollo de células y tejidos nos permite incrementar la eficiencia de los protocolos de micropropagación debido a que el ritmo de respuesta del tejido, el reconocimiento de los distintos estadios en el desarrollo celular y los grupos de células permite tomar decisiones importantes en el cultivo de tejidos vegetales (Ferreira *et al.*, 2008).

Los estudios histológicos también permiten identificar las estructuras del explante y confirmar, si efectivamente constituyen embriones somáticos, para posteriormente estudiar tanto los cambios ultraestructurales como el proceso de formación, desde su origen hasta su germinación, entre otros (Ferreira *et al.*, 2008).

Algunas de las aproximaciones donde el estudio histológico ha resultado crucial para entender el proceso de la embriogénesis somática y mejorar el desarrollo de protocolos de micropropagación es el caso de *Hevea brasiliensis* y *Carya illonensis*, en el cual a través de estudios histológicos se pudo determinar el momento óptimo para su subcultivo (Michaux-Ferriere y Carron, 1989). En el caso de la palma aceitera (*Elaeis sp.*) se logró una excelente documentación sobre el origen perivascular y multicelular de la embriogénesis somática cuando se usan explante de hoja (Schwendiman *et al.*, 1990) o subepidérmica y unicelular cuando se usan explantes de embriones cigóticos (Kanchanapoom y Domyoas, 1999). En cacao (*Theobroma cacao* L.) se logró hacer una comparación entre los

embriones cigóticos y los embriones somáticos obtenidos de explantes florales y se encontró que en embriones somáticos existe una ausencia de almidón y reservas de proteínas a comparación de los embriones cigóticos (Chanatisig, 2004). Y más recientemente el trabajo de Ferreira y colaboradores (2008), con *Acromia aculeata*, donde mediante estudios histológicos se observó dos tipos de embriogénesis somática: unicelular y multicelular, que resalta no solo el origen si no también el rendimiento de germinación de cada uno de los casos. Además tiene una fuerte importancia en las estrategias de mejoramiento genético, estudios fisiológicos y genéticos.

3.2.1 Técnicas y proceso

Las diferentes técnicas histológicas van encaminadas a preparar un tejido para su observación con el microscopio, ya sea óptico o electrónico. Existen diversos procedimientos para la observación de tejidos y células, dentro de los cuales encontramos tres principales técnicas histológicas: 1) vitales, la cual nos permite observar tejidos y células vivas; 2) supravitales, en los que las células o tejidos vivos se cultivan para su observación *in vivo*; y 3) postvitales, los cuales las células mueren en el proceso pero las características morfológicas y moleculares se conservan (según el tipo de técnica), este tipo de técnica es la más común para el estudio de tejidos y células vegetales provenientes del cultivo *in vitro* (Kiernan, 2002).

El proceso histológico en sí, es una serie de técnicas y métodos seguidos para el estudio de la morfología de tejidos. Estos son muy diversos y dependerá de lo que se desee observar para elegir el proceso histológico *ad hoc*.

Como es lógico, el proceso histológico inicia con la obtención del tejido, ya sea una muestra de algún órgano vegetal, explantes o estructuras obtenidas por medio de cultivo de tejidos vegetales. Las muestras seleccionadas son habitualmente fijadas con soluciones que tienen la función de mantener las estructuras celulares y tejidos en congelación rápida, denominadas fijadores.

Posterior a la fijación, normalmente se procede a incluir el tejido, esto con la finalidad de endurecer la muestra y que pueda cortarse, ya que entre más finos se requieran los cortes, más duro debe estar el tejido. Para ello se utilizan sustancias hidrosolubles, por lo que es necesario deshidratar los tejidos y sustituir el agua por disolventes orgánicos liposolubles para que las resinas o ceras puedan incluir el tejido.

Una vez incluidos los tejidos es posible cortarlos, para lo cual en la mayoría de los casos es necesario un micrótopo. Existen diversos micrótopos, de mano, de mesa, de congelación, de rotación, deslizamiento, por mencionar algunos. Para elegir un micrótopo se debe tener en cuenta los siguientes puntos: 1) la necesidad de proceder sin incluir; 2) las dimensiones de la muestra; 3) el tipo de bloque; 4) la necesidad de obtener las secciones seriadas; 4) el grosor de las secciones y por último 5) el tiempo disponible para obtener las secciones (Sandoval- Zapotitla *et al*, 2005).

Obtenidas las secciones se procede a teñir las muestras con colorantes hidrosolubles, para lo cual es necesario eliminar el medio de inclusión para que los colorantes puedan infiltrarse en los tejidos. Los colorantes se extraen de vegetales o de animales; en su caso, los artificiales del carbón mineral, tienen la propiedad de teñir debido a que poseen cromóforos o auxocromos (Sandoval- Zapotitla *et al*, 2005).

Los tejidos procesados se observarán al microscopio, ya sea óptico o electrónico según el objetivo de la observación. El electrónico permite gran poder de resolución, pues se pueden observar características ultraestructurales, mientras que el óptico tiene menor resolución, pero permite varios modos de observación, por ejemplo: fluorescencia, contraste de fases, polarización o contraste de interferencia diferencial.

4. Embriogénesis somática en *Cocos nucifera* L.

Desde la década de los 70´s se han realizado estudios *in vitro* en *Cocos nucifera* iniciando por sus requerimientos nutricionales, dentro de los cuales destaca el trabajo de Eeuwens, quien estableció un medio con especificaciones nutrimentales tanto inorgánicas como orgánicas para *Cocos nucifera* llamado Medio Y3 (Eeuwens, 1976, 1978).

4.1 Estudios relevantes

En las tres últimas décadas se han reportado diversos estudios que intentan la micropropagación de coco, utilizando diversos explantes como: hojas inmaduras, raíces, embriones e inflorescencias inmaduras, así como óvulos infértiles (Branton y Blake 1983 a, b, 1986; Buffard-Morel *et al.*, 1988; Karunaratne y Peiyapperuma, 1989; Shirke *et al.*, 1993; Verdeil *et al.*, 1994; Blake y Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998; Pereda *et al.*, 2007) con diferentes grados de éxito (Azpetia-Morales *et al*, 2009). Sin embargo los mejores resultados se obtuvieron de inflorescencias inmaduras (Verdeil *et al.*, 1994; Blake y Hornung, 1995) y con plúmula (Chan *et al*, 1998).

Chan y colaboradores (1998) obtuvieron un protocolo para la embriogénesis somática de coco, el cual resultó reproducible y con una mayor eficiencia en comparación con otros protocolos en los que utilizaron diferentes explantes. Sin embargo, es todavía un rendimiento muy bajo para aplicarse de manera práctica y rentable (Azpetia-Morales, 2009). En especial por los largos tiempos de inducción de callo embriogénico (3 a 6 meses de cultivo) y regeneración (6 a 9 meses).

En general los bajos rendimientos de callo embriogénico (menor al 40%) y de embriones somáticos por explante en esta especie se debe principalmente a las siguientes causas: intensa oxidación de los tejidos, la respuesta heterogénea, a su alta formación de raíces, una alta formación de tejido haustorial (Verdeil y Buffard - Morel, 1995), así como la malformación de embriones somáticos provocados por muy altas concentraciones de auxinas, citocininas o ambas (Azpetia-Morales, 2009). Por todo lo anterior y debido a su

baja capacidad embriogénica y de regeneración el cocotero es considerado una especie recalcitrante (Fernando y Gamage, 2000).

Cuadro 4. Estudios de embriogénesis somática en coco, respuesta y rendimiento. En el siguiente cuadro se muestra los estudios más relevantes con explantes embrionarios en distintos medios de cultivo.

Autor / Año	Explantes	Medio	Respuesta	Rendimiento (% promedio de callo o callo embriogénico obtenido)
Chan <i>et al.</i> , 1998	plúmula	Sales y vitaminas Y3 2.5 g Carbón activado 22.7mg 2,4- D.	Callo embriogénico.	40 % 4 – 6 meses
Perera <i>et al.</i> , 2004	Segmentos del eje embrionario	Sales Y3 Vit Morel & Wetmore 2.5 g Carbón activado 22.7 mg 2,4- D	Callo	60 % 15 – 30 días
Sáenz <i>et al.</i> , 2006	Plúmula	Sales y vitaminas Y3 2.5 PVP 0.16 mg 2,4- D.	Callo embriogénico	42 % 4 – 6 meses
Perez-Nuñes <i>et al.</i> , 2006	Plúmula	Sales y vitaminas Y3 2.5 g Carbón activado 132mg 2,4- D.	Callo embriogénico	38 % 2 – 3 meses.

4.2 Estudios estructurales de embriogénesis cigótica y somática en coco

En cuanto a los estudios estructurales de embriogénesis somática en coco, Haccius y Philip (1979) utilizaron técnicas histológicas para describir el desarrollo de embriones cigóticos, lo cual generó un buen primer acercamiento para entender la embriogénesis somática en coco (Sáenz *et al.*, 2006). Dentro de estas descripciones va desde los estadios proembrionarios, hasta la formación del embrión cigótico completo (Figura 10).

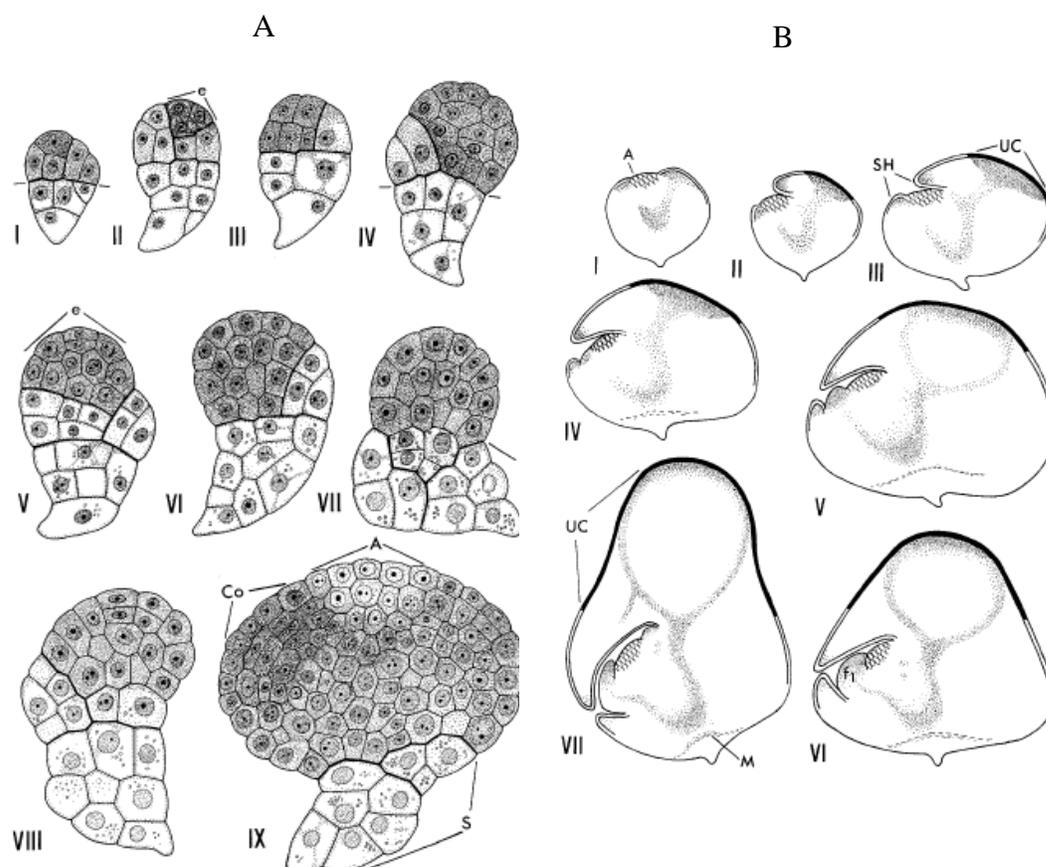


Figura 10. Embriogénesis cigótica de *C. nucifera*, muestra los distintos estadios de la embriogénesis de coco desde proembrión hasta los estadios iniciales de embrión globular (A) y de embrión globular tardío, hasta la fase final donde se observa el embrión cigótico maduro (B) (Haccius y Philip, 1979).

Lo anterior ha llevado a distintos grupos de trabajo a realizar estudios histológicos para complementar sus resultados y comprender el proceso de la embriogénesis somática en el coco, a manera de describir los cambios en el explante durante el proceso (Branton y Blake, 1983b; Verdeil *et al.*, 2004; Blake y Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998). Actualmente los protocolos con mejores resultados, son aquellos en los que se utilizan explantes embrionarios principalmente plúmula (Verdeil *et al.*, 2001; Fernando *et al.*, 2003; Pérez-Núñez *et al.*, 2006; Sáenz *et al.*, 2006; Azpetia *et al.*, 2009) y en menor frecuencia aquellos que utilizan ovarios no fertilizados (Pereda *et al.*, 2007). De estos trabajos se han derivado estudios histológicos de gran importancia, los cuales tratan de explicar el origen y el proceso de embriogénesis somática en coco, así como la problemática ligada a la germinación de dichos embriones.

De los trabajos que destacan en el análisis histológico y sus resultados son los siguientes:

Verdeil et al., 2001. Reportaron los cambios ultraestructurales que ocurren durante el proceso de formación de células embriogénicas en inflorescencias inmaduras. Observan que cuando el callo es introducido a medio de inducción embriogénica hay un cierre de los plasmodesmos y una deposición callosa. Las células embriogénicas se caracterizaron por presentar una profunda invaginación en la membrana nuclear, proliferación de dictiosomas con emisión de vesículas de Golgi directamente relacionadas con un incremento del engrosamiento de la pared celular.

Fernando et al., 2003. Realizaron un análisis histológico de plantas regeneradas de plúmulas de coco. Reportaron la presencia de domos meristemáticas activos, resultado de la división de células provasculares de los primordios foliares. Estas nuevas zonas meristemáticas posteriormente dieron origen a masas meristemáticas periféricas, el crecimiento de un callo heterogéneo el cual desarrolló células embriogénicas, protodermis, parénquima primario, masas meristemáticas periféricas y parénquima secundario. Además, reportan que el primer estado de desarrollo de nódulos embriogénicos se caracteriza por la ruptura de las masas meristemáticas, seguido de la formación de protuberancias elongadas, las cuales formaron la epidermis. Esto provee evidencias del origen multicelular de la embriogénesis somática. El trabajo resalta tanto la baja regeneración de este tipo de embriones, como evidencia de embriogénesis somática incompleta.

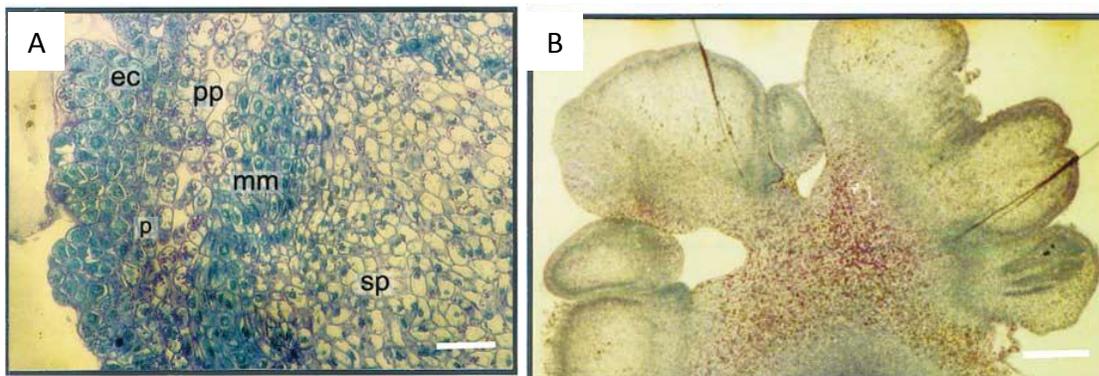


Figura 11. (A) Sección longitudinal del callo formado a las 10 semanas después del cultivo: mm- masas meristemáticas se forman por la división de las células provasculares, ec células altamente embriogénicas formadas por la división de las células del protodermo; p – protodermis; pp- parénquima primario; sp- parénquima secundario (barra de 0.05 mm). (B) Estructuras embriogénicas de origen multicelular (barra 0.54 mm)

Sáenz et al., 2006. Realizaron un análisis histológico y morfológico durante la formación de embriones somáticos de coco a partir de explante de plumula. Reportan que el origen del callo aparentemente es de células provasculares, asociado a masas meristemáticas periféricas. Estas zonas meristemáticas a los 60-75 d forman nódulos meristemáticos, de los cuales se forman estructuras globulares embriogénicas (75-95 d). Estas estructuras desarrollan una capa de protodermis y empiezan a fusionarse en estructuras con

aparición elongada. Este trabajo apoya la observación de que los embriones somáticos son de origen multicelular y destaca que la secuencia de eventos que llevan a una embriogénesis somática capas de germinar es la misma que la de embriones cigóticos: individualización del protodermis, individualización de haces provasculares y áreas meristemáticas que den origen a meristemos apicales y más tarde un meristemo radical. La germinación se dio solo en algunos embriones somáticos, aquellos con desarrollo irregular y estructuras aberrantes, no germinaron.

Además esquematizaron el desarrollo de embriones somáticos:

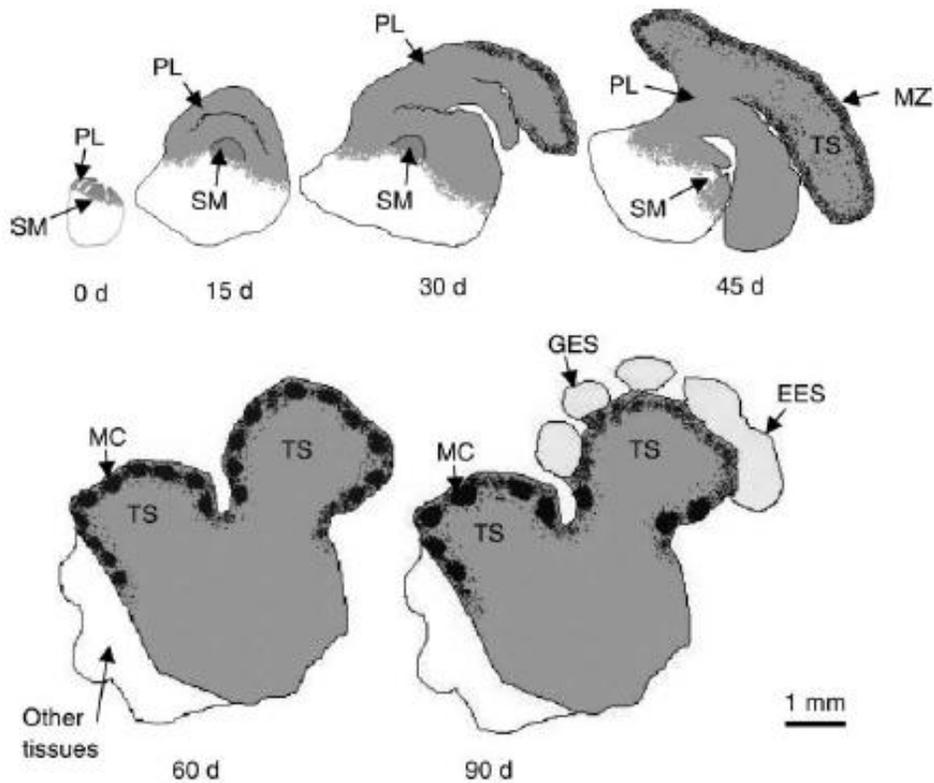


Figura 12. Representación esquemática de los cambios que se producen durante la formación del callo inicial y de callo embriogénico a partir de explantes plúmula cultivadas *in vitro*. Al día 15, la coalescencia de las hojas plumular externos (PL). En el día 30 el PL ha crecido y formado un callo inicial. En el día 45 se observó la formación de una zona de meristemática (MZ) cerca de la periferia de este callo. El callo forma estructuras translúcidas (TS). En 60d se observa la formación de centros meristemáticos (MC) en el TS. En 75-90 aparecieron d la formación de globular (GES) y alargadas estructuras embriogénicas (EES). Las áreas blancas corresponden a otros tejidos y SM al brote meristemático (Sáenz *et al.*, 2006).

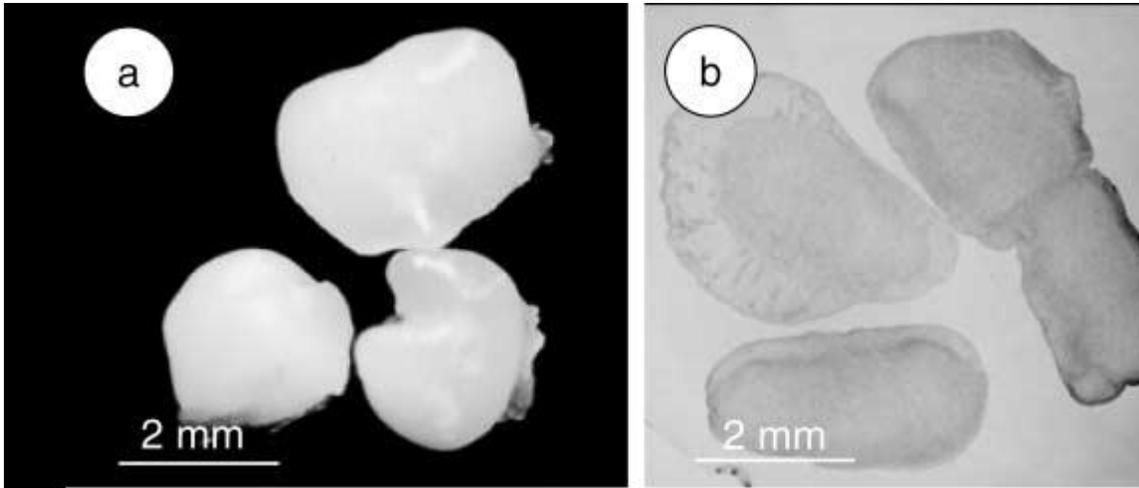


Figura 12.Embriones somáticos *C. nucifera*. (a) embriones somaticos. (b) Sección transversal de embriones somáticos (Sáenz *et al.*, 2006).

Perrera *et al.*, 2007. Utilizaron un explante novedoso para la generación de embriones somáticos, el ovario no fertilizado. Dentro de sus estudios histológicos, destaca la formación de células embriogénicas a partir de tejido de tipo cambium; además menciona que utilizando este tipo de explante se observan el desarrollo de embriones tanto de origen multicelular como unicelular. Describe la morfología de ambos tipos de embriones somáticos, resaltando características de reconocimiento como son las reservas de almidón, proteínas y anatomía de las células meristemáticas. Con este protocolo se obtienen embriones somáticos que desarrollan tanto la parte apical como la basal, lo cual permite incrementar el porcentaje de germinación como la clonación de individuos selectos, ya que no hay polinización cruzada.

Azpeitia *et al.*, 2009. Se estudió la influencia de la subdivisión del callo embriogénico en la formación de embriones somáticos, incluye el estudio histológico y morfológico de los callos embriogénicos y subdivisiones. Se presentaron principalmente dos respuestas morfogénicas: 1) diferenciación de embriones somáticos de 15 a 30 días; y 2) desdiferenciación de embriones somáticos después de los 30 d, con crecimiento de callo tipo haustorial en la periferia causando así la disminución de embriones somáticos. Y aunque a los 15 d fue posible observar embriones somáticos bien formados no se observó el meristemo apical en los cortes histológicos. Estas anomalías en el desarrollo se atribuye a diversos factores, principalmente provocado tanto por la expresión genética asociada a los niveles supra o infra óptimos de auxinas y citocininas.

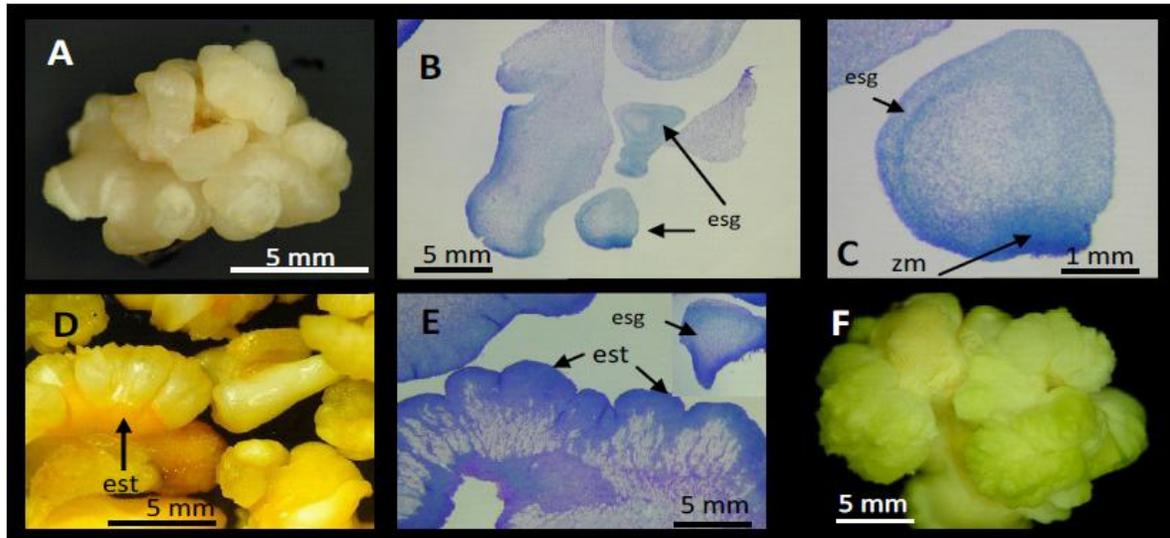


Figura 13. Formación de embriones somáticos (ES) a los 15 y 30 días de cultivo en callos embriogénicos (CE) y en subdivisiones de callos embriogénicos (SCE). En A se presenta un CE a los 15 días de cultivo e histología del CE en B, observándose ES globulares (esg) y en C una zona meristemática (zm) de un ES donde se origina la raíz. En D se muestra un grupo de ES torpedo (est) originados de SCE a los 15 días de cultivo, los cuales se observan sincronizados y en el corte histológico se observan ES tipo torpedo (est) elongados y fusionados (E) así como ES globulares (esg) observados en menor cantidad. En F se muestra el CE a los 30 días de cultivo

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de coco en México tiene una gran importancia y potencial en muchas regiones costeras del país, sin embargo debido a un atraso tecnológico, a la reducción de rendimiento, al envejecimiento de las plantaciones y al ataque de agresivas plagas entre otros factores, la producción no alcanza ni a cubrir la demanda nacional, por lo que las industrias se han visto en la necesidad de importar, cuando México podría incluso ser capaz de exportar cantidades importantes de materia prima y productos procesados derivados del coco, como Brasil o los países asiáticos del Pacífico.

La problemática asociada al cultivo de coco en México es compleja y debe ser atacada de forma integral y multidisciplinaria como la problemática misma lo requiere. El cultivo de tejidos vegetales es capaz de realizar aportaciones importantes en la solución de dicha problemática mediante la micropropagación o multiplicación rápida de especies criollas y especies resistentes a patógenos y de alta producción. Se espera que al renovar las plantaciones tanto con clones híbridos como con especies criollas de polinización abierta y asociarlas a otros cultivos tropicales sean capaces de incrementar la producción y reactivar la economía local, al tiempo que se mantiene la biodiversidad y la complejidad del ecosistema.

El presente estudio representa una base importante en la construcción de un protocolo de micropropagación reproducible y rentable que a través del control de la oxidación y un uso particular de reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos, permita la inducción y el desarrollo exitoso de embriones somáticos. Este estudio forma parte de un proyecto interdisciplinario mucho mayor para reactivar la economía de regiones costeras del país aprovechando el potencial de las regiones costeras hacia el cultivo de coco, generando una tecnificación capaz de generar productos de alto valor agregado, que exista el comercio justo orgánico, promover el policultivo, favorecer la biodiversidad, el aprovechamiento sustentable y que exista una derrama económica que mejore significativamente la calidad de vida de los productores y los habitantes de la región.

OBJETIVOS: GENERALES Y PARTICULARES

Objetivo General

Establecer un protocolo reproducible para la inducción de callo embriogénico y control de la oxidación de embriones somáticos de *Cocos nucifera* L.

Objetivos particulares

- Establecer un método práctico de aislamiento de embriones cigóticos de coco.
- Establecer un método de desinfección en el cual se reduzca la oxidación de los tejidos y que aumente la respuesta en la etapa de inducción.
- Evaluar la respuesta de los segmentos embrionarios cigóticos como explante.
- Seleccionar los mejores medios de cultivo en cuanto a compuestos orgánicos, inorgánicos, reguladores de crecimiento y menor oxidación para la inducción de callo embriogénico de coco y embriones somáticos.
- Confirmar la presencia de embriones somáticos mediante estudios histológicos estructurales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos planteados, el presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas, una primera etapa de establecimiento de cultivo *in vitro* de coco, y una segunda etapa en la que se realizó un estudio histológico estructural para la confirmación de embriogénesis somática.

La primera etapa se realizó en el laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la segunda parte se desarrolló en el Laboratorio de Anatomía e Histología Vegetal del Jardín Botánico en el Instituto de Biología, con la asesoría en selección de técnicas de la Dra. Estela Sandoval.

Ruta crítica

Etapa I	Etapa II
Selección de material biológico	Selección de callos
Aislamiento de embriones cigóticos	Procesamiento de muestras
Desinfección	Obtención de cortes
Inducción	Tinción
	Observación al microscopio e interpretación
	Análisis de resultados

ETAPA I: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO *IN VITRO* DE COCO

1. Aislamiento de embriones cigóticos maduros

Material Biológico

El material biológico consistió en cocos (*Cocos nucifera* L.) comerciales maduros (10 a 11 meses después de la polinización) de la variedad Alto del pacífico provenientes de Costa Rica y Costa grande Guerrero, previamente seleccionados por tamaño por distribuidor con el cual se realizó la compra.

Método Chan et al., 1998

La extracción se inicia con la localización del embrión, el cual se encuentra inmerso dentro del endospermo sólido, este se puede ubicar desde el exterior de la nuez, por los micrópilos, ya que se localiza en el más suave de los tres.

Para la extracción del embrión primero se inició con un corte transversal de la nuez, lo que permitió exponer el endospermo sólido. En la cara apical (donde se encuentran los micrópilos) se observó un pequeño botón parecido a un ombligo, el cual reveló la ubicación exacta del embrión. En este punto se clavó un sacabocados de 1.4 cm de diámetro, y se extrajo un cilindro de endospermo sólido, el cual contiene el embrión.

Este cilindro se depositó en un frasco con agua desionizada estéril para posteriormente llevarse a la campana de flujo laminar para la desinfección.

Método Chan et al. Modificado

Se localizó el embrión y se procedió a la extracción, primero se realizaron cortes longitudinales en un extremo de la nuez, con un machete previamente desinfectado con hipoclorito de sodio comercial al 6% (v/v), se abrió un orificio en el endocarpo y se dejó expuesto el endospermo sólido y con ello se logró drenar el endospermo líquido. Una vez vacía la nuez del endospermo líquido, se hizo un corte transversal de la misma, permitiendo la exposición del endospermo sólido. En la cara apical (donde se encuentra el micrópilo) se observó una pequeña depresión, el cual revela la ubicación exacta del embrión. Con ayuda de un sacabocados de 1.4 cm de diámetro se extrajo el embrión, el cual se encontraba inmerso en un cilindro de endospermo sólido.

Este cilindro se depositó en un frasco con agua desionizada estéril y posteriormente se trasladó a la campana de flujo laminar para su desinfección (Figura. 14).

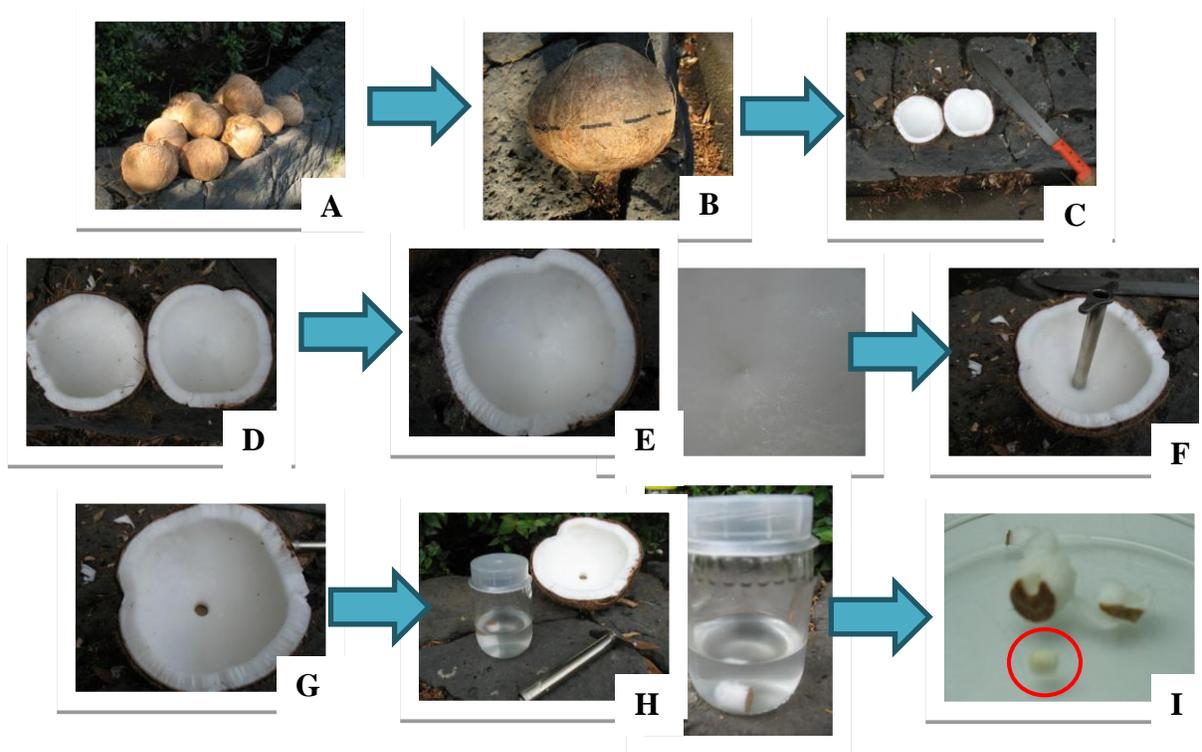


Figura 14. En este diagrama se observa el proceso de extracción de los embriones cigóticos de coco. A. Se observa la nuez del coco. B. Se hace explícito el eje transversal de la nuez. C y D. Se observa la nuez partida a la mitad por su eje transversal. E. Un acercamiento de la cara apical de la nuez, donde se ubica el embrión. F y G. Extracción del cilindro de endospermo con el embrión inmerso con un sacabocados. H. Cilindro con embrión en frasco con agua desionizada estéril. I. Disección del cilindro en condiciones asépticas, donde se hace evidente (circulo rojo) el embrión cigótico.

2. Desinfección y disección de embriones cigóticos maduros.

Se probaron dos métodos de desinfección y disección de embriones cigóticos maduros, el primero (Método 1) basado en el método de desinfección y disección de Chan *et al.*, 1998 y el segundo (Método 2) modificado de Chan *et al.*, 1998 y la disección en base al método de Pereira *et al.*, 2004.

Método 1

Posterior a la extracción del cilindro de endospermo, en la campana de flujo laminar se extrajeron los cilindros de endospermo y se depositaron en un frasco con una solución de etanol al 70% durante tres minutos. Posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua desionizada estéril, se depositaron en un frasco con una solución de hipoclorito de sodio

comercial al 6% (v/v) durante 20 minutos, y luego se lavaron 3 veces con agua desionizada estéril. De uno en uno se fueron sacando los cilindros de endospermo sólido de la solución, se colocaron en forma individual sobre una caja Petri y con ayuda de bisturí y unas pinzas se extrajeron los embriones, los cuales tienen una forma cilíndrica y miden en esta etapa entre 3 y 5 mm. Los embriones se depositaron en un frasco con solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (v/v) durante 10 minutos. Se enjuagaron 3 veces con agua desionizada estéril y se disectaron los ejes embrionarios (Figura 15). Finalmente, se sembraron los ejes embrionarios en el medio de cultivo manteniendo su polaridad.

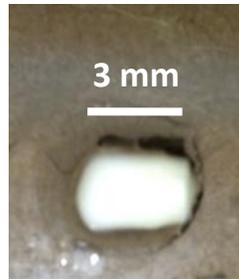


Figura 15. Embrión cigótico de coco disectado de un embrión cigótico (Peralta, 2013).

Método 2

En la campana de flujo laminar se extrajeron los cilindros de endospermo y se depositaron en un frasco con etanol al 70% durante dos minutos, posteriormente se depositaron en un frasco con hipoclorito de sodio comercial al 6% (v/v) durante 10 minutos. Se sacaron, de uno en uno, los cilindros de endospermo sólido de la solución, se colocaron sobre una caja Petri y con ayuda de bisturí y unas pinzas se disectaron los embriones, los cuales tienen una forma cilíndrica y miden en esta etapa entre 3 y 5 mm. Los embriones se depositaron en un frasco con solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (v/v) durante 5 minutos. Se enjuagó con agua desionizada estéril y se depositó en un frasco con solución antioxidante (Ácido cítrico 150 mg L^{-1} , Ácido ascórbico 150 mg L^{-1} y cisteína 200 mg L^{-1}), los embriones se mantuvieron en esta solución durante su disección. En la disección, se utilizó el método de Pereira *et al.* (2004), primero se obtuvieron los ejes embrionarios, cortando longitudinalmente los lados y posteriormente se dividió en tres segmentos: apical, medio y basal (Figura 16). Finalmente, los segmentos de embrión se sembraron en el medio de cultivo manteniendo su polaridad.

Se realizaron observaciones semanales y en estas observaciones se tomaron los siguientes datos: contaminación, respuesta a callo y oxidación (de 60% en adelante).

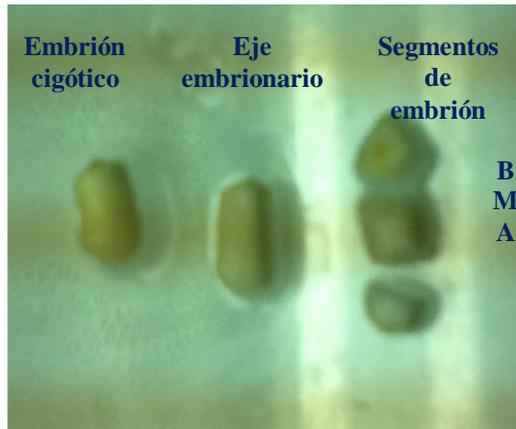


Figura 16. Obtención de los segmentos de embrión. B. Basal, M. Medio y A. Apical.

3. Inducción de callo embriogénico de coco.

Se probó la eficiencia de inducción de callo embriogénico y el control de la oxidación de siete medios (Cuadro 6). Se usaron seis embriones cigóticos por tratamiento, cada uno segmentado en tres segmentos (apical, medio y basal) y se realizaron dos repeticiones.

Cuadro 6. Medios de inducción de callo embriogénico de *C. nucifera* L. Donde C. es el control, C-Y3 es aquel que solo tiene compuestos orgánicos Y3, C-C20 solo tiene compuestos orgánicos coctel 20, C-K que tiene vitaminas Kao y sus combinaciones (Y3.C20, Y3.K y C20.K)

Medio I. Inducción							
1 litro	C	C-Y3	C-C20	C-K	C-Y3.C20	C-Y3.K	C-C20.K
Sales Y3 (Eeuwens, 1976).	√						
L-Prolina	2.5 g						
Adenina	1mg						
Sacarosa	60 g						
PVP	2.5 g						
Compuestos Orgánicos Y3 (Eeuwens, 1978)	√				√	√	
Coctel 20			√		√		√

KAO				√		√	√
2,4-D	0.2 mg						
Ac. Cítrico	150 mg						
Ac. Ascórbico	150 mg						
Cisteína	200 mg						
Gelzan®	3 g						

La decisión de probar los medios de cultivo anteriores se tomo en base a la experiencia con medios de cultivo ya probados en otras especies monocotiledóneas y en base a trabajos previos con distintos genotipos (híbridos y enanos) y en revisión bibliográfica.

Preparación de medios de cultivo

Para todos los medios se utilizaron las sales inorgánicas Y3 (Eeuwens, 1976), Sacarosa 60 g L⁻¹, L- Prolina 2.5 g L⁻¹, Adenina 1 mg L⁻¹, PVP 2.5 g L⁻¹, Ácido cítrico 150mg L⁻¹, Ácido ascórbico 150mg L⁻¹ y cisteína 200mg L⁻¹. Según el tratamiento se utilizaron diferentes compuestos orgánicos: Los compuestos orgánicos Y3 (Eeuwens 1976), Coctel 20 (Olivera, Patente en trámite), Vitaminas Kao y Michayluk (KAO) y la combinación Y3-Coctel20, Y3-KAO y Coctel20-KAO. En cuanto a los reguladores de crecimiento, se utilizó 2,4 -D 0.2 mg L⁻¹ (esta concentración se seleccionó en base a trabajos previos con distintos genotipos, datos no publicados, y en base a revisión bibliográfica). Todos los medios se gelificaron con Gelzan® 3.3 g L⁻¹. El pH se ajustó a 5.7 con NaOH al 3N, 1N y 0.1N o con HCl 1N y 0.1 N según fuera necesario. Se sirvió 30 ml de medio de cultivo en frascos Gerber® de primera etapa y posteriormente se esterilizó en autoclave vertical a 120°, 1.2 kg/cm² durante 18 minutos.

Incubación y subcultivo

Todos los cultivos se incubaron en un cuarto de incubación a 25± 2 °C en oscuridad. Los cultivos en inducción se subcultivarán a los 30 días y de ahí no se subcultivarán hasta el término del tratamiento de inducción al día 60.

Evaluación de las diferentes respuestas.

Se realizaron observaciones cada quince días y se tomaron los siguientes datos: formación de callo, apariencia, cambios estructurales, grado de oxidación y necrosis. Todos estos

datos se registraron por cada explante. La oxidación se midió en una escala de X (5-20 %), 2X (21-40%), 3X (41-60%), 4X (61-80%) y 5X (81-100%).

Para la evaluación de los medios de inducción se tomaron dos indicadores: porcentaje de formación de callo embriogénico y porcentaje de necrosis (Cuadro 7). Esto con la finalidad de evaluar tanto la respuesta de la formación de callo embriogénico como el control de la oxidación de cada medio, y de esta manera poder contrastar ambas respuestas y seleccionar los mejores medios en función de ambos parámetros.

Cuadro 7. Indicadores para la evaluación y selección de medios de cultivo.

Porcentaje de formación de callo embriogénico	Porcentaje de necrosis.
El porcentaje de formación de callo es la relación del número de explantes que presenta callo entre el total de los explantes por tratamiento multiplicado por cien.	El porcentaje de necrosis es la relación del número de explantes con oxidación 5X entre el total de explantes por tratamiento multiplicado por cien.
$\%FC = \left(\frac{EC}{TE} \right) \cdot 100$	$\%N = \left(\frac{E5X}{TE} \right) \cdot 100$
%FC = Porcentaje de formación de callo. EC = Explantes con callo. TE= Total de explantes por tratamiento	%N = Porcentaje de necrosis E5X= Número de explantes con oxidación 5X. TE= Total de explantes por tratamiento.

Con base a estos parámetros, se seleccionó el medio de inducción que mayor porcentaje de formación de callo presentó y menor porcentaje de necrosis, representado por el factor de eficiencia de inducción del medio de cultivo (FEIM). El FEIM tiene una escala de -1 a 1 (siendo 1 el valor de mayor eficiencia) y está representado por la siguiente fórmula:

$$FEIM = \frac{(\%_fFC - \%_fN)}{100}$$

FEIM= Factor de eficiencia de inducción del medio de cultivo.

%FC = Porcentaje final de formación de callo.

%N = Porcentaje final de necrosis.

Evaluación del rendimiento por tipo de segmento

Se evaluaron los rendimientos de los distintos segmentos embrionarios (basal, medio y apical) al día 60. El rendimiento se basó en número promedio de estructuras embrionarias por explante. Posteriormente se realizó un promedio por tratamiento.

ETAPA II: ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Elección de muestras provenientes del cultivo in vitro.

Se eligieron dos callos del medio C-Y3 y dos callos C-C20. Estos callos tenían 45 días en sus respectivos medios de cultivo. El callo C- Y3 presentaba una consistencia dura y la clara presencia de embriones somáticos tipo torpedo color mostaza mientras que el callo del tratamiento C-C20 presentaba una consistencia suave y presentaba desarrollo de estructuras proembrionarias tipo globular en la periferia.



**Figura 17. Callo embriogénico
proveniente del tratamiento C-Y3**



**Figura 18. Callo embriogénico
proveniente del tratamiento C-C20**

Procesamiento de las muestras

Se fijaron las muestras con Navashin durante 24 horas. Para la infiltración e inclusión del material se utilizó el método directo con deshidratación con alcohol terbutílico (TBA) en las siguientes concentraciones 35, 50, 60, 70, 80, 95, 100, 100, 100% 24 horas cada paso. Después del tercer cambio de TBA puro, se colocó el frasco con las muestras en TBA en la estufa a 58 °C y se empezó a infiltrar con Paraplast®, agregando cada hora un par de escamas hasta que se sustituyera completamente el TBA por el Paraplast® puro. Posteriormente se retiró la parafina de las muestras y se reemplazó con Paraplast® puro previamente fundido (48 h antes).

Una vez infiltrados los tejidos se pasó a realizar la inclusión, donde se utilizaron moldes cubiletes hechos de papel encerado; en estos moldes se orientó la muestra lo mejor

posible, tratando de seguir la polaridad de la mayoría de las estructuras embrionarias. Se vació Paraplast® fundido en un solo movimiento en el molde con la muestra previamente orientada y se dejó enfriar 24 h en el refrigerador.

Las muestras incluidas en Paraplast® se colocaron sobre cubos de madera y se cortaron con un micrótopo de rotación obteniendo cortes de ocho micras. Estas laminillas se observaron en el microscopio óptico. Se seleccionaron los mejores cortes y se tiñeron con verde rápido y safranina "O" con la finalidad de observar las zonas meristemáticas y contrastar los elementos estructurales.

RESULTADOS

ETAPA I: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO *IN VITRO* DE COCO

1. Aislamiento de embriones cigóticos maduros

Se probaron dos métodos de aislamiento de embriones cigóticos maduros, uno descrito por Chan *et al.*, 1998 y otro modificado de éste según la experiencia adquirida al realizar el método de Chan *et al.*, 1998.

La diferencia radica en la facilidad y limpieza del aislamiento; en el método de Chan *et al.*, 1998 es muy fácil que la nuez se quiebre, corriendo el riesgo de que el embrión se vea afectado. En cambio, en el método modificado que se siguió aquí, al drenar primero el endospermo líquido es más fácil el manejo de la semilla, tanto para realizar el corte transversal como para evitar que saliera rápidamente el endospermo líquido. Además, de esta manera no se desperdició el endospermo líquido y pudo tener un uso posterior.

2. Desinfección y disección de embriones cigóticos maduros.

Se probaron dos métodos de desinfección y de disección de embriones. El primero (Método 1) basado en el método de desinfección y disección de Chan *et al.*, 1998 y el segundo (Método 2) modificado de Chan *et al.*, 1998 y la disección en base al método de Perera *et al.*, 2004.

En ambos métodos se logró el establecimiento aséptico del 99% de los embriones; sin embargo, presentaron diferencias en cuanto a la oxidación y capacidad de respuesta como se puede observar en las Figuras 19 y 20.

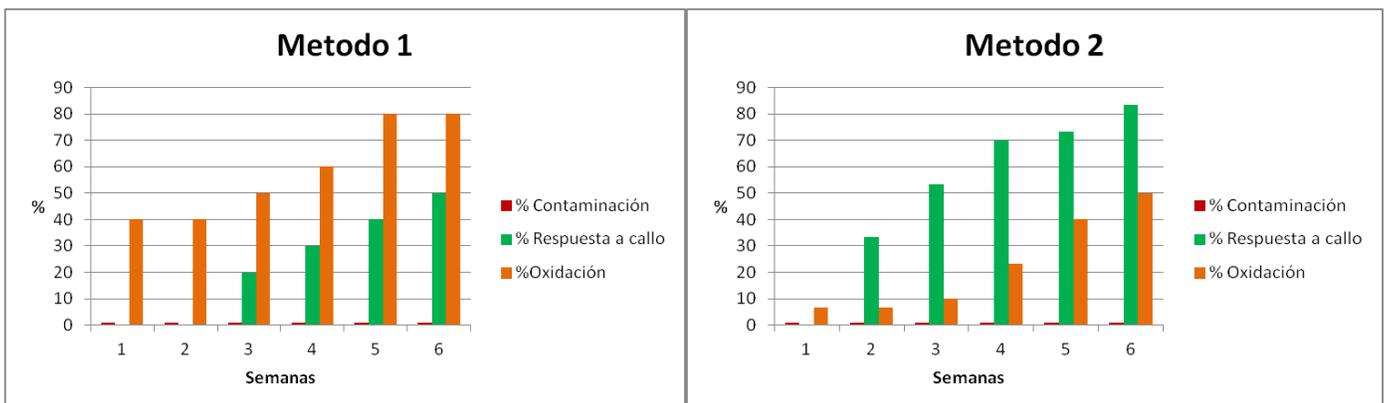


Figura 19 y 20. En ambos métodos el porcentaje promedio de contaminación es cero, sin embargo la gran diferencia entre el método 1 y el 2 es la oxidación de los explantes a lo largo de las semanas (mayor en el Método 1) y por otro lado la respuesta hacia callo embriogénico (mayor en el Método 2).

En el Método 2 se observó una rápida respuesta en cuanto a la formación de callo (segunda semana) y, al mismo tiempo, presentó una menor oxidación a diferencia del Método 1, el cual mostró una oxidación mayor desde la primera semana y una menor presencia de callo en tiempos más largos. Estos resultados son importantes, ya que al reducir la oxidación se mejora la respuesta en tiempo y calidad.

3. Inducción de callo embriogénico de coco.

Se probó la eficiencia de siete medios para la inducción de callo embriogénico, donde se compararon tres diferentes compuestos orgánicos (Compuestos Orgánicos Y3, Coctel 20, KAO), sus combinaciones (Y3-Coctel 20, Y3-KAO y KAO-Coctel20) y un control (C).

Para medir la eficiencia de los medios se utilizaron dos indicadores: el porcentaje de formación de callo (%FC) y el porcentaje de necrosis (%N), con los cuales se construye el factor de eficiencia de inducción del medio de cultivo (FEIM), con el cual es posible medir la eficiencia partiendo de valores cualitativos.

Los resultados en general presentaron una tendencia muy clara, ya que los medios con compuestos orgánicos individuales (Y3, Coctel 20 y KAO) registraron un alto porcentaje de callo, mientras que las combinaciones (Y3-C20, Y3-K y C20-K) y el control negativo al día 60, no sobrepasó el 20% de explantes con formación de callo (Figura 21).

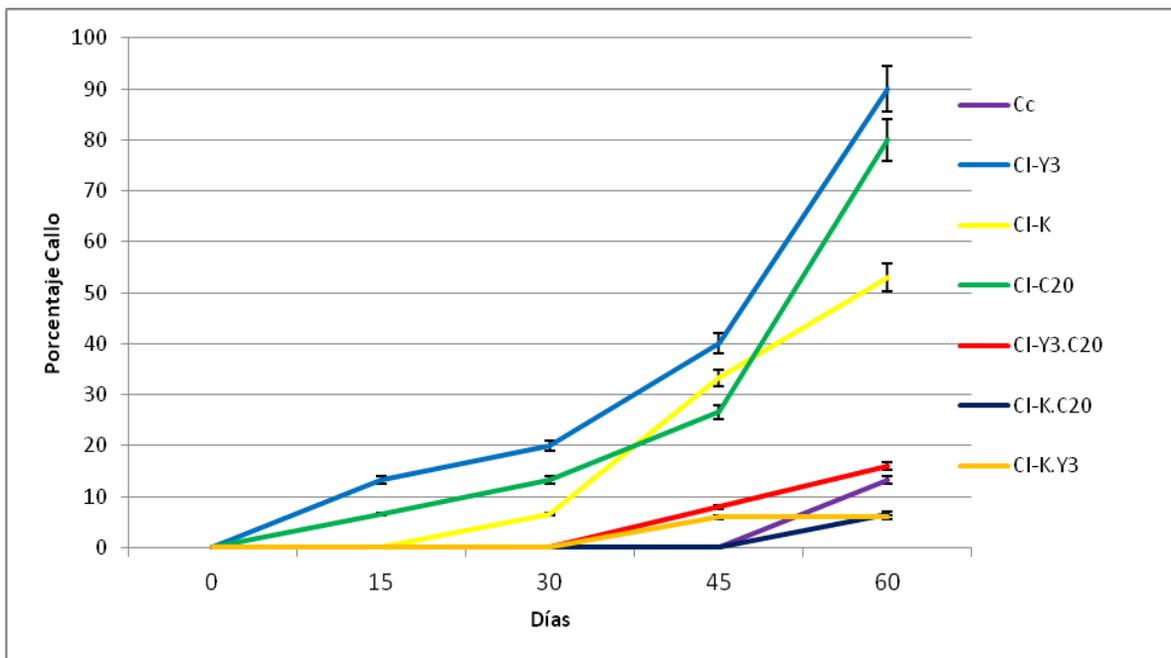


Figura 21. Los tratamientos Y3 y C20 son los que desarrollaron un mayor porcentaje de callo embriogénico (mayor al 70%), mientras que las combinaciones y el control tuvieron menos del 20% de callo embriogénico.

Así mismo se observó que los tratamientos con mayor porcentaje de necrosis, son aquellos con las combinaciones de compuestos orgánicos (CI-Y3C20, CI-Y3K y CI-KC20), el control negativo (CI-C) e inesperadamente aquel que contenía vitaminas KAO (CI-K). Mientras que los tratamientos CI-Y3 y CI-C20, fueron los que mejor control de la oxidación y por lo tanto presentaron menor porcentaje de necrosis (Figura 22).

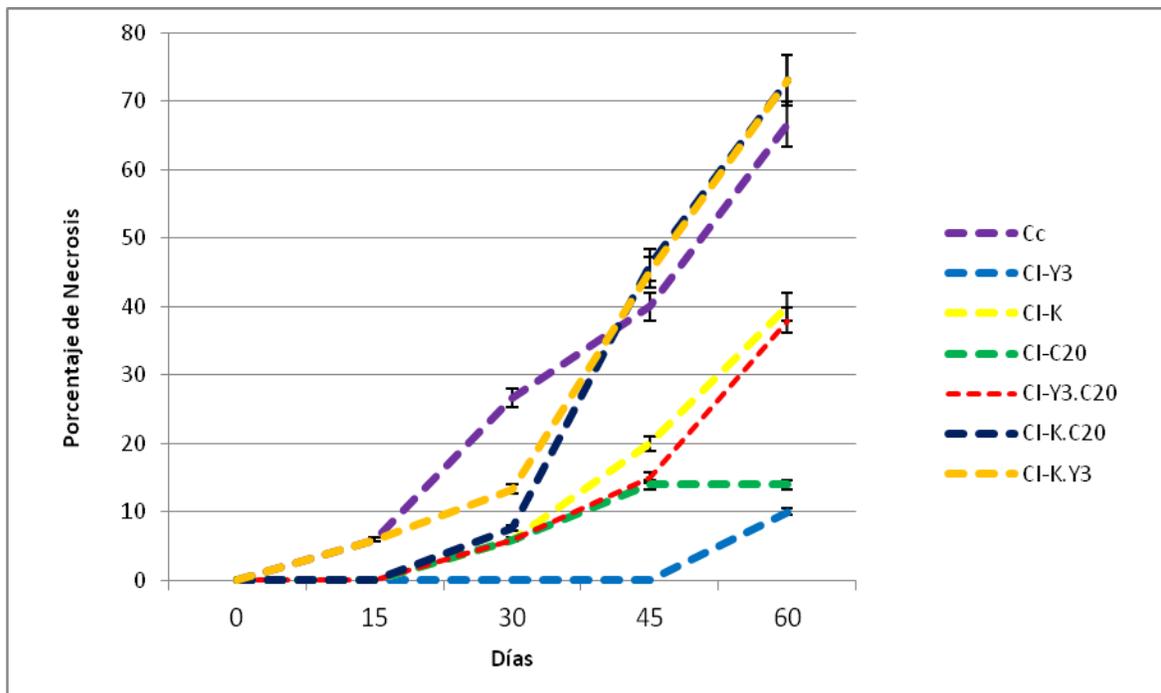


Figura 22. Los tratamientos Y3 y C20 son los que menor oxidación presentaron a lo largo del tratamiento, mientras que el resto de los tratamientos presentaba fuerte oxidación en las primeras semanas y posterior necrosis.

Con los porcentajes obtenidos y en base al factor de eficiencia de inducción del medio de cultivo (FEIM) propuesto. Son los medios CI-Y3 y CI-C20 los de mayor eficiencia para la formación de callo con valores de 0.8 y 0.57 respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Factor de eficiencia de inducción de los diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Porcentaje final de formación de Callo (% FC).	Porcentaje Final de necrosis (%N)	FEIM	Rendimiento promedio de embriones somáticos
CI- C	13.3	66.6	-0.533	
CI-Y3	90	10	0.8	
CI-K	53	40	0.13	
CI-C20	71	14	0.57	
CI-Y3.C20	16	38	-0.22	
CI-Y3.K	7.6	76	-0.684	
CI-K.C20	6	73	-0.67	

En este experimento una respuesta temprana a la formación de callo se observó en los tratamientos CI-Y3 y CI-C20, los cuales contenían compuestos orgánicos Y3 y coctel 20 respectivamente. En estos tratamientos se observa que en los primeros 15 días ya hay explantes con evidentes inicios de callo tipo embriogénico y estructuras embrionarias, mayormente en los segmentos medio y apical (Ramírez y Olivera, sin publicar), y a los 30 días un alto porcentaje de explantes ya presentan callo tipo embriogénico y estructuras embriogénicas globulares (Figura 23). Esto es de suma importancia, ya que la mayoría de los protocolos reportados en la literatura tardan de 3 a 6 meses (cuadro 4) para obtener este tipo de respuesta, por lo que los resultados obtenidos en este ensayo, representan una importante ventaja en el establecimiento de un protocolo de micropropagación rentable.

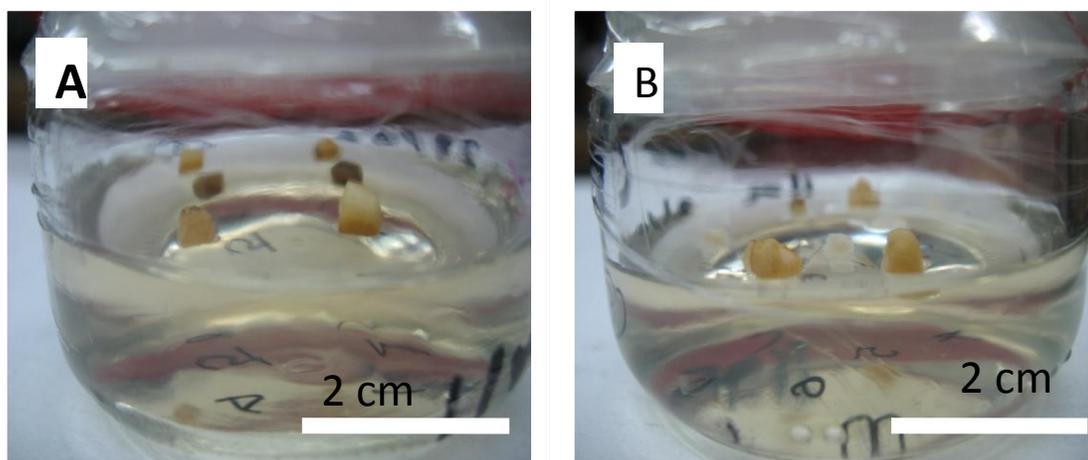


Figura 23. (A) Segmentos de embrión cigótico medio CI-Y3. (B) Medio CI-C20 en los primeros 15 días de su cultivo.

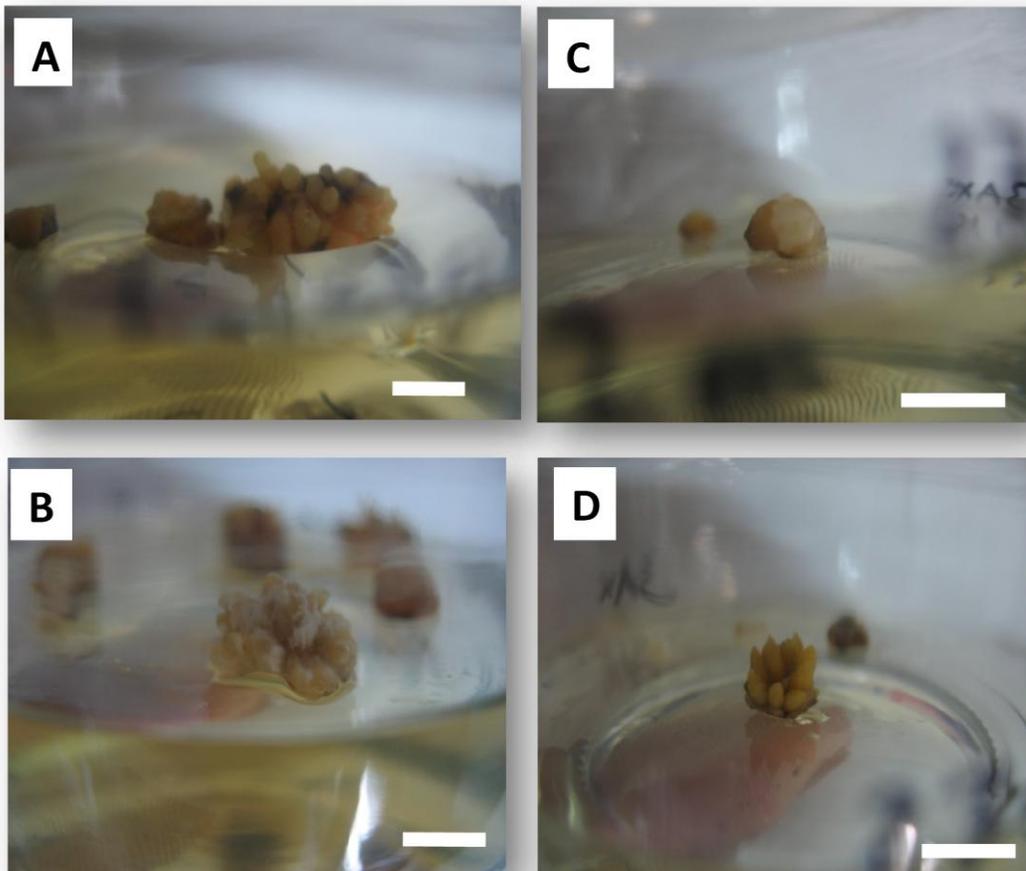


Figura 24. (A) CI-C20 callo embriogénico. (B) CI-C20 se observa un incremento de masa celular así como inicio de callo embriogénico. (C) CI-Y3 se observa crecimiento de callo en un área del explante. (D) CI-Y3 se observa los ESPES. A los 60 días de inducción. (Bar 1cm)

Evaluación del rendimiento por tipo de segmento

El resultado de los conteos de estructuras embrionarias por tipo de segmento se encuentran muy ligados a los resultados anteriores, los tratamientos CI-Y3 y CI-C20 fueron los que mayor número de estructuras embrionarias presentaron por explante y en total del tratamiento.

Es importante mencionar que en todos los tratamientos se observa un gradiente en la formación de estructuras embrionarias, donde el mayor número de estas se desarrolla en el segmento apical, seguido del medio y finalmente el basal.

Cuadro 9. Número total y promedio de estructuras embrionarias según el tipo de segmento.

Medio de cultivo	Número de embriones somáticos por tipo de segmento embrionario.						Total de estructuras por tratamiento.	Promedio por segmento por tratamiento
	Apical		Medio		Basal			
	Total	Promedio por segmento	Total	Promedio por segmento	Total	Promedio por segmento		
C	7	3.5	2	2	2	2	11	2.5
CI-Y3	93	7.8	68	6.8	34	3.8	195	6.1
CI-C20	89	10.3	82	9.4	51	7.3	222	9
CI-K	25	3.1	28	4	10	1.4	63	2.9
CI-Y3.C20	3	1.5	2	1	1	1	6	1.2
CI-Y3.K	2	1	0	0	0	0	3	0.3
CI-C20.K	1	1	1	1	0	0	3	0.7

ETAPA II: ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Se realizaron cortes histológicos de los embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo, las cuales son semejantes con las descritas con otros grupos de trabajo (Fernando *et al.*, 2003; Sáenz *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2007; Azpeitia *et al.*, 2004).

En los cortes histológicos se logró identificar zonas meristemáticas activas, domos meristemáticos, zonas meristemáticas asociadas a procambium vascular y estructuras con una clara polaridad. Además se encontraron diferencias importantes entre los dos mejores tratamientos C-Y3 y C-C20. Las diferencias que se identificaron fueron principalmente el posible origen de las estructuras embrionarias, ya que mientras que en el C-Y3 se observó un posible origen unicelular, en los cortes del callo C-C20 se observa que el origen es más bien multicelular. Otra diferencia relevante es el tipo de embriones que se desarrollan: mientras que en los tratamientos C-Y3 se observan estructuras embrionarias elongadas, en el tratamiento C-C20 se observan en su mayoría estructuras tipo globulares.

Por último, se observaron algunas anomalías en el desarrollo de las estructuras embrionarias, las cuales podrían estar asociadas a la baja germinación de estos embriones somáticos, como la falta de desarrollo del meristemo apical lo cual explica las pruebas de germinación en donde, frecuentemente se desarrollan raíces pero no en la parte aérea.

Tratamiento C-Y3

El callo proveniente de este tratamiento, presentó un color oscuro debido a la oxidación del tejido, sin embargo en la parte interna del callo, el tejido era de color marrón, de consistencia dura y forma globular; en la superficie se observaron de 4 a 6 estructuras embrionarias elongadas de color beige. En los cortes más relevantes obtenidos del callo del tratamiento C-Y3 se hizo evidente la embriogénesis somática (Figura 14, 15 y 16).

En la Figura 25 se observa una imagen panorámica en campo claro de una estructura embrionaria en donde se puede apreciar una clara polaridad y el desarrollo de zonas meristemáticas tanto apicales como basales, además de un gran número de sustancias de reserva a la periferia. Este embrión se encuentra en proceso de madurez, ya que se desprendió con mucha facilidad del resto del callo y por la forma.

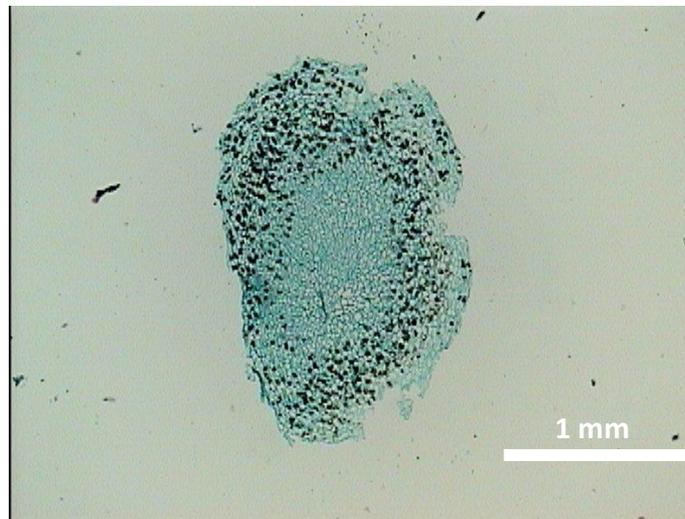


Figura 25. Estructura embrionaria de tipo globular del tratamiento C-Y3, donde se observa la polaridad apical y basal así como tejido provascular. Panorámica en campo claro 5x

En la figura 26 se observa una estructura en proceso de madurez que aún se encuentra unida al callo, en el cual se distingue su individualización cuando empieza a desarrollar una protodermis y hebras vasculares en el centro; esta estructura recuerda a un embrión cigótico de coco en proceso de maduración. De lado izquierdo (indicado con una flecha blanca) se encuentra el callo tendiendo hacia una estructura embrionaria (preglobular), sin embargo presenta una malformación que normalmente lleva al crecimiento de estructuras embrionarias incapaces de germinar.

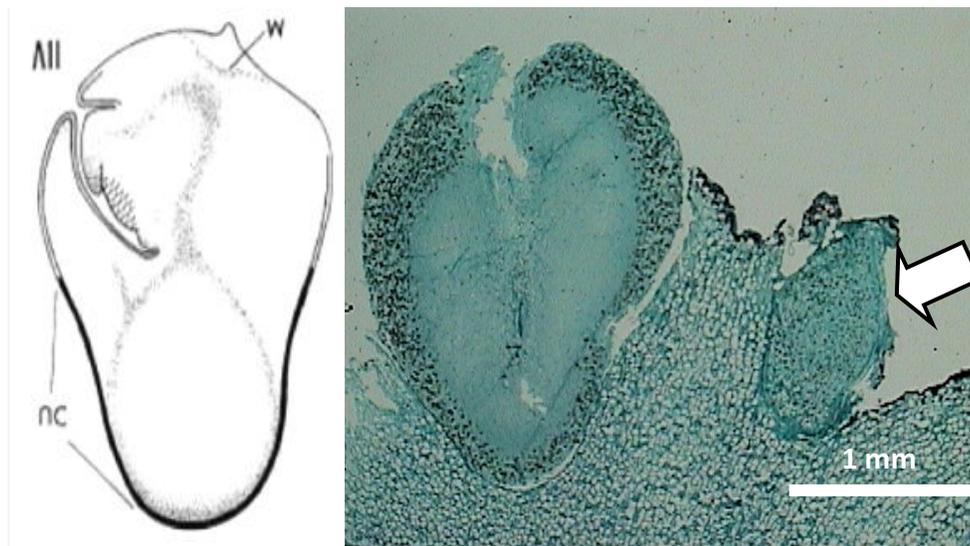


Figura 26. Embrión somático en proceso de maduración (imagen comparativa de un embrión cigótico maduro) acompañado de una estructura proembrionaria que presenta una posible malformación apical. Tratamiento C-Y3. Campo claro 2.5x.

En la figura 27, se muestra un embrión somático elongado ya individualizado, en la cual se observa claramente una polaridad y se aprecia el inicio del desarrollo de áreas meristemáticas tanto apical (ma) como basal (mb).

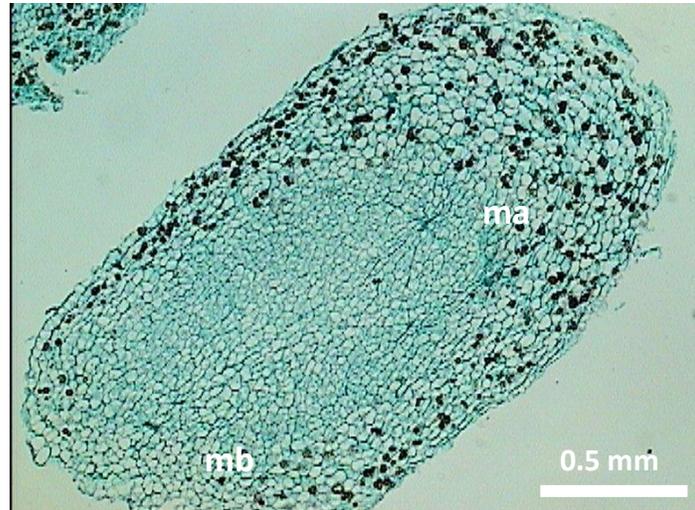


Figura 27. Embrión somático elongado con polaridad en el tratamiento C-Y3. Campo claro 10x.

Tratamiento C-C20

El callo embriogénico de este tratamiento era de color beige y de consistencia suave que se desarrolla de forma irregular presentando un desarrollo entre 8 y 15 estructuras embrionarias tipo globular o de forma de oreja en la periferia. De las tomas más relevantes en este tratamiento encontramos callo con múltiples estructuras tanto

proembrionarias como embrionarias de tipo globular, fusión de estructuras embrionarias, domos meristemáticas y zonas meristemáticas asociadas a tejidos provasculares.

La figura 28 es una panorámica del callo, en la cual se puede apreciar el desarrollo de diversas estructuras proembrionarias en la periferia. En la parte inferior de la imagen se ve una estructura fusionada (ef), lo cual representa una limitación común en este tratamiento para un buen desarrollo de los embriones somáticos.

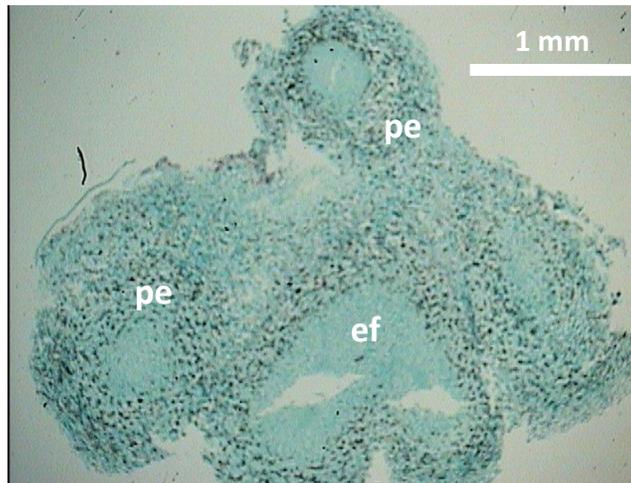


Figura 28. Conjunto de estructuras periféricas en el callo embriogénico de tratamiento C-C20. Campo claro 2.5x

Otra de las estructuras que se identificaron fueron los domos meristemáticos asociados a tejidos provasculares (dm), los cuales han sido descritos por otros autores como resultado de la división de células provasculares que posteriormente dan origen estructuras embrionarias (Figura 29) (Fernando *et al.*, 2003; Sáenz *et al.*, 2006).

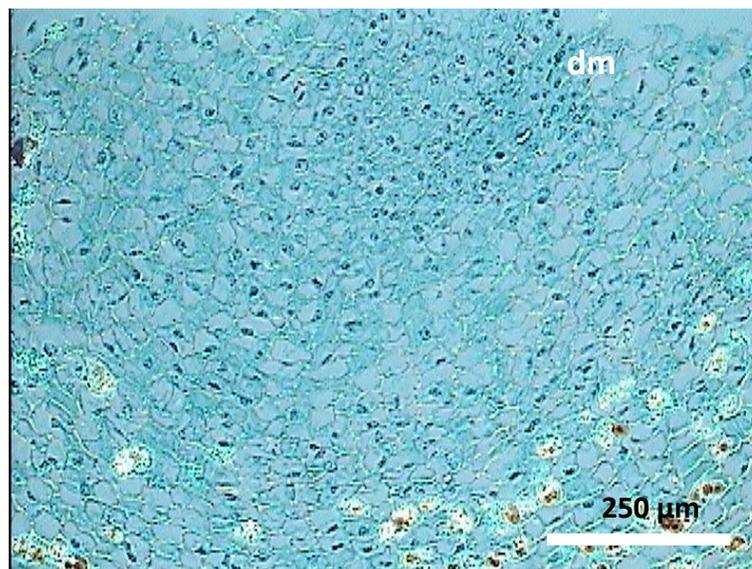


Figura 29. Domo meristemático asociado a tejido provascular en el tratamiento C-C20. Campo claro 20x.

En la figura 30 se observa una fuerte actividad celular, ya que están presentes células en división celular en el domo meristemático.

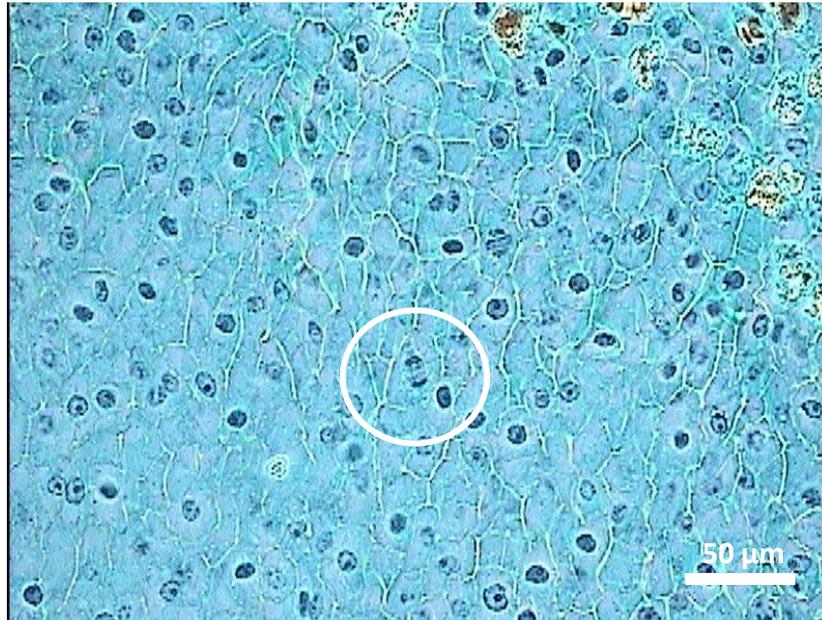


Figura 30. División celular en domo meristemático tratamiento C-C20. Campo claro 40x.

En la siguiente figura se muestran haces provasculares en medio del callo en el cual se observa actividad meristemática, este puede ser un paso anterior al desarrollo de los domos meristemáticos observados en la figura anterior.

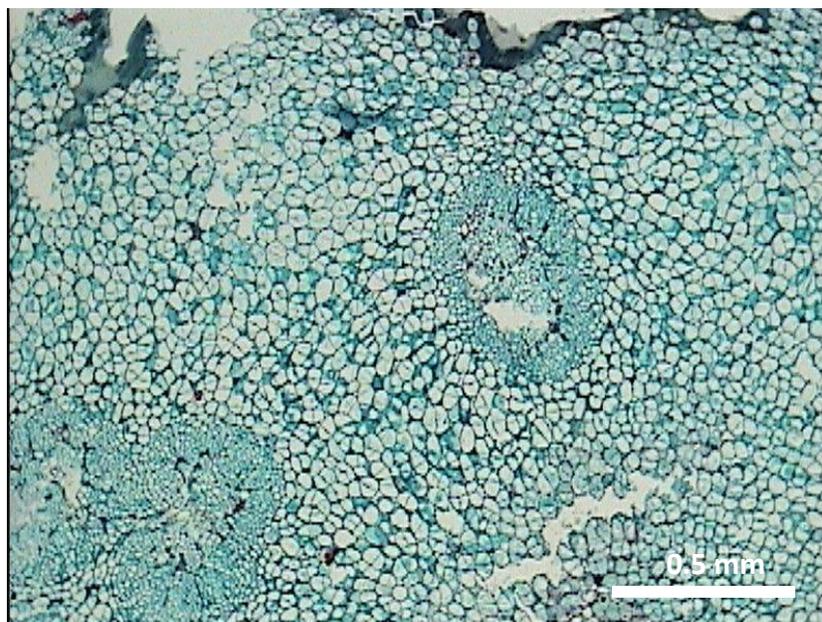


Figura 31. Tejido provascular asociado a domos meristemáticos en medio del callo C-C20. Campo claro 5x.

En los cortes de callo en el tratamiento C-C20, se encontraron un mayor número de malformaciones, principalmente la falta de desarrollo de meristemos apicales y la fusión de estructuras embrionarias, entre otras aberraciones. En la Figura 32 y 33 se observan distintas anomalías en el desarrollo de los embriones somáticos, la más común es la falta de desarrollo del meristemo apical (Figura 32) y por otra parte la malformación y fusión de estructuras embrionarias en desarrollo (Figura 33) reportadas también por otros equipos de trabajo (Fernando *et al.*, 2003; Sáenz *et al.* 2006; Perera *et al.*, 2007; Azpeitia *et al.*, 2009).

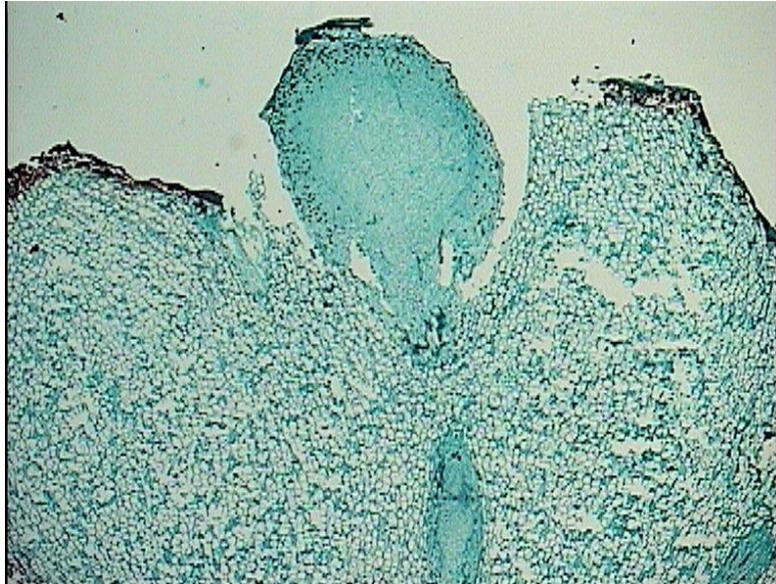


Figura 32. Campo claro 2.5x. Anormalidades en las estructuras embrionarias en las cuales no se desarrolla la zona apical.

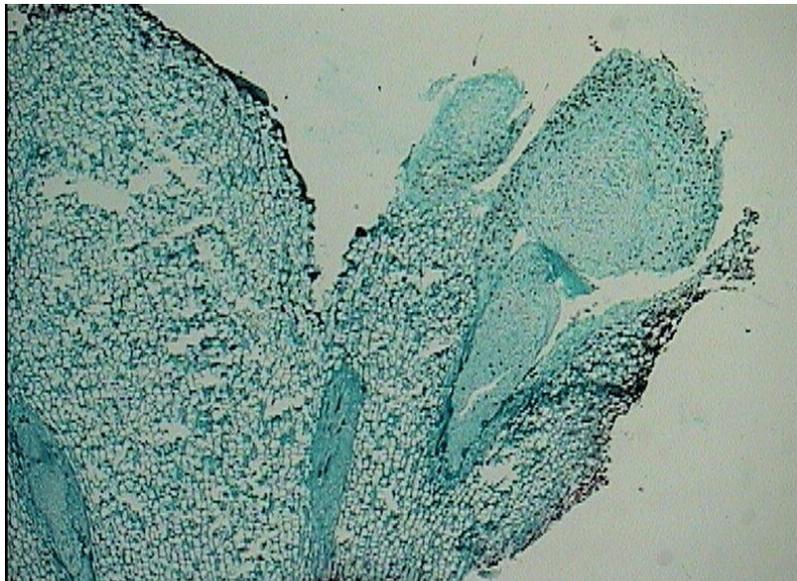


Figura 33. Campo claro 2.5x. Anormalidades en las estructuras embrionarias, malformación y fusión de estructuras de tendencia embrionaria.

DISCUSIÓN

ETAPA I: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO *IN VITRO* DE COCO

1. Aislamiento de embriones cigóticos maduros

Material biológico

La elección de los embriones cigóticos como explante se eligió debido a su gran potencial embriogénico, ya que son tejidos jóvenes que todavía se encuentran en constante división celular, además se han reportado protocolos exitosos con el uso de este tipo de explante. En cuanto a la idea de segmentar, resultado de los trabajos de Perera y colaboradores (2004) y tras pruebas preliminares observamos que mediante este método era posible utilizar menos material biológico, se reducía el tiempo de respuesta, así como la oxidación del tejido, y se obtenían un mayor número de embriones somáticos por explante.

Aislamiento de los embriones

De los dos métodos de extracción probados en este estudio (Chan *et al.* 1998 y el modificado) el que mostró mayor efectividad fue el modificado por nuestro equipo, donde las principales modificaciones fueron: el corte para extracción del endospermo líquido, y el corte trasversal; estas modificaciones evitaron en gran medida que la nuez se quiebre y dañe el embrión. Por otro lado facilita el manejo de la semilla para realizar el corte trasversal necesario para la extracción del embrión con el sacabocados, al tiempo que se recupera el endospermo líquido.

Este método de aislamiento o extracción del explante implementado en este trabajo, resultó práctico para la extracción de grandes cantidades de material, ya que no requiere fuerza sino destreza en la ejecución de los cortes y garantiza el aislamiento aséptico de los explantes, la mínima exposición y oxidación que se traducen en una mejor respuesta del tejido.

2. Desinfección y disección de embriones cigóticos maduros

A lo largo de todos los ensayos realizados con diferentes explantes de coco, se ha observado y constatado que una buena desinfección es un factor clave para el control de la oxidación que garantiza la respuesta del explante. Para lo cual realizó en la desinfección una combinación de:

- Alcohol etílico: Es un antiséptico muy común que actúa desnaturalizando proteínas y se emplea en una solución acuosa al 70% v/v, ya que si se usa en concentraciones mayores deshidrata a los microorganismos conservándolos en lugar de destruirlos

y en concentraciones menores no es eficiente. El alcohol etílico está categorizado como un bactericida y moderadamente un fungicida, su efectividad es rápida pero de corta duración debido a que se evapora con mucha facilidad, sin embargo potencializa la acción de otros antisépticos como el hipoclorito de sodio (Vives *et al.*, 2004).

- Hipoclorito de sodio: cuando está en contacto con el agua se forma ácido hipocloroso, el cual actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos, oxida grupos –SH y ataca grupos aminos e índoles. Sin embargo al mismo tiempo libera oxígeno, el cual es un oxidante fuerte por lo que hay que tener cuidado en su uso para evitar la oxidación y necrosis de los tejidos vegetales (Microbiología e inmunología, 2012).

El método de desinfección empleado en este trabajo es una modificación de Chan y colaboradores (1998), éste se modificó en ensayos previos. Este método de desinfección no sólo permitió la obtención de cultivos asepticos (99%), sino que también reduce significativamente la oxidación de los tejidos. Esto se logró reduciendo los tiempos de exposición a los agentes desinfectantes y manteniendo al tejido en una solución antioxidante justo antes de la siembra, los cuales actúan de la siguiente forma:

- Ácido ascórbico: es un agente reductor que puede reducir, así como neutralizar especies reactivas del oxígeno tal como el peróxido de hidrógeno. Además de sus efectos antioxidantes directos, el ácido ascórbico es también un sustrato para la enzima antioxidante ascorbato peroxidasa, una función que es particularmente importante en resistencia al estrés en plantas (Padayatty *et al.*, 2003; Shigeoka *et al.*, 2002).
- Ácido cítrico: se utiliza como sinérgico para aumentar la efectividad de los antioxidantes. Su mecanismo de acción se basa en formar complejo con los metales que catalizan las reacciones de oxidación.
- Cisteína: se considera un antioxidante, ya que es un precursor del glutatión, que es el mayor antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos de oxígeno reactivo, así como el mantenimiento de los antioxidantes exógenos, como las vitaminas C (ácido ascórbico) y E en sus formas reducidas (activas) (Noctor *et al.*, 1998).

La reducción de los tiempos de exposición de los agentes desinfectantes es posible, debido a que el embrión se encuentra inmerso en endospermo sólido, lo cual lo mantiene protegido de agentes infecciosos hasta el momento de la siembra, y por otro lado a la

sinergia de los compuestos antioxidantes que se adhieren al tejido justo antes de su siembra.

En cuanto a la disección, en este estudio se describe un método de disección modificado donde se segmenta el eje embrionario del embrión cigótico de coco Perera *et al.*, 2004. Este tipo de explante ha mostrado una buena respuesta en menor tiempo, en comparación a otros como plúmula, inflorescencias inmaduras, hojas inmaduras, raíces u óvulos infértiles en términos de callo embriogénico (Branton y Blake 1983 a, b, 1986; Buffard-Morel *et al.*, 1988; Karunaratne y Periyapperuma, 1989; Shirke *et al.*, 1993; Verdeil *et al.*, 1994; Blake y Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998; Perera *et al.*, 2007). Perera *et al.*, 2004, ha observado que este tipo de explante muestra formación de callo embriogénico en los primeros 15 días, mientras que otros autores han observado el inicio de callo de 2 a 4 meses (Rillo, 1989; Chan *et al.*, 1998), 4-6 meses (Verdeil *et al.*, 1992; Verdeil *et al.*, 1994; Sáenz *et al.*, 2005; Perez-Nuñez *et al.*, 2006) después de la siembra en diferentes explantes. En los resultados obtenidos en nuestros estudios los explantes respondieron durante la primera semana de tratamiento y a los quince días observamos la presencia de callos que incrementaron su masa en los días posteriores, lo que puede representar una ventaja significativa en la búsqueda de un protocolo de micropropagación.

La edad del explante es importante, y se ha demostrado que embriones de más de 11 meses no producen callos, la mayoría de ellos germina en el cultivo (Karunaratne *et al.*, 1989, Chan *et al.*, 1998; Perera *et al.*, 2007). Los mejores embriones para cultivo y obtención de callo embriogénico son los de 8 y 10 meses, debido a su alta actividad celular. Después del séptimo mes la morfología del embrión cambia drásticamente y la proliferación de callo es pobre, es por eso que la embriogénesis somática es altamente dependiente del estado de desarrollo del embrión.

En este trabajo se sembró el eje embrionario en tres segmentos, los cuales se tomaron como iguales: apical, medio y basal. Sin embargo, de estos tres segmentos se observa que tienen un gradiente de respuesta hacia callo embriogénico, en el cual el primero en responder es el apical, seguido del medio y al final el basal. Al paso de los días el tejido basal es el que más incrementa su masa, generando un callo esponjoso con pocas estructuras embrionarias en comparación con los otros dos segmentos, debido probablemente a que es el segmento más cercano al tejido haustorial. Es importante señalar que algunos segmentos apicales desarrollaron un ápice y en corto tiempo se pigmentaron de verde desarrollando estructuras foliares, mientras que las estructuras embrionarias a su alrededor degeneraron, muy probablemente a un gradiente de auxinas endógenas.

3. Inducción de callo embriogénico de coco

Para medir la efectividad de los distintos medios empleados en este estudio se tomaron dos indicadores clave, el porcentaje de formación de callo y el porcentaje de necrosis u

oxidación severa. Estos indicadores permitieron evaluar la efectividad de los medios, ya que el éxito de inducción, proliferación de un callo embriogénico, desarrollo de embriones somáticos y germinación de los mismos, no sólo está ligado a la formación de callo sino que también está íntimamente ligado a la oxidación y al estrés que presenta el explante.

Para seleccionar los mejores medios de cultivo para la inducción de callo embriogénico, desarrollo de embriones somáticos y mínima oxidación, se tomaron diversas estrategias de control de oxidación como: adición de sustancias antioxidantes al medio, crecimiento en oscuridad, elección de concentraciones de reguladores de crecimiento y la elección de medio en cuanto compuestos orgánicos.

En cuanto a la adición de sustancias antioxidantes, se le adicionó a todos los medios de cultivo: Ácido cítrico (200mg/L), Ácido ascórbico (200mg/L), cisteína (200 mg/L) y PVP (3g /L). Estos compuestos son sustancias que retrasan o previenen la oxidación del sustrato oxidable en el que se encuentran. El término sustrato oxidable se refiere a prácticamente todas las biomoléculas que se encuentran en los tejidos vivos, particularmente proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. La importancia que tienen estas sustancias en el cultivo *in vitro* es vital, pues la oxidación causa recalcitrancia, elimina la posibilidad de respuesta morfogenética, genera estrés celular y muerte de los tejidos (necrosis) (Dan, 2008). En el caso específico del coco, la experiencia en trabajos previos con diferentes tipos de explante y en especial aquellos no embriogénicos, nos indican que la adición de antioxidantes es indispensable para que los tejidos sembrados tengan la capacidad de responder en mejores tiempo a los estímulos *in vitro*, de otra manera presentan recalcitrancia y necrosis.

En el caso particular del PVP, es un polímero soluble en agua, formado por cadenas de múltiples vinilpirrolidonas, el cual tiene una excelente acción de absorción de compuestos fenólicos y tiene la ventaja de que no adsorbe otros componentes del medio de cultivo, como lo hace el carbón activado. Actualmente el PVP es ampliamente utilizado en biotecnología vegetal tanto para la purificación de ADN, como en cultivos de tejidos vegetales (Perl *et al.*, 1996). En el cultivo *in vitro* de coco se ha logrado sustituir al carbón activado en la fase de inducción, ya que no sólo es un excelente absorbente de compuestos fenólicos, sino que también, a diferencia del carbón activado, no adsorbe otros componentes del medio de cultivo requeridos para las respuestas morfogenéticas, como reguladores de crecimiento o vitaminas, principalmente el 2,4-D. El trabajo de Sáenz *et al.*, 2005 demuestran que al sustituir el carbón activado por PVP, se reduce 100 veces la concentración usada de 2,4-D sin modificar la respuesta hacia callo embriogénico y se reduce la oxidación de la misma forma.

Otro factor clave en el control de la oxidación y respuesta del explante, son las condiciones de iluminación, ya que si el explante es expuesto a la luz durante la etapa de inducción, el tejido se oxida y no responde (Chan *et al.*, 1998). Por otra parte, corroboramos con otros autores (Chan *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2004; Sáenz *et al.*, 2005; Perez-Nuñez *et al.*, 2006) que el subcultivo estresa mucho a los tejidos y aunque se les da

baño con solución antioxidante entre cada subcultivo, este muestra oxidación a las pocas horas y si el tejido aun no responde hacia callo e inicia a oxidarse, la mayoría de las veces pierde su capacidad de respuesta.

En cuanto a los reguladores de crecimiento se ha observado que el uso de las auxinas tiene un efecto favorable en la inducción de callo. La respuesta embriogénica se obtiene con concentraciones bajas de 2,4-D sin citocininas. (Chan *et al.*, 1998. Karunaratne *et al.*, 1989). Por tal motivo en este estudio hemos empleado únicamente el 2,4-D en una concentración muy puntual (0.2mg/L), determinada por investigación bibliográfica y experimentos previos en donde se encontró que si la concentración es muy alta el tejido se necrosa y cuando es muy baja el tejido no responde (Chan *et al.*, 1998).

La elección de los medios de cultivo se logró con una amplia investigación bibliográfica y diversos ensayos, los cuales llevaron a determinar y a confirmar los datos publicados de la ineficiencia de los medios de cultivo líquidos. Estos medios son utilizados con frecuencia para el control de la oxidación con excelentes resultados para diversas especies, sin embargo en el caso específico del coco se ha reportado por diversos autores y hemos comprobado que inhibe el crecimiento y la respuesta del explante.

Por último, el factor que permitió seleccionar el mejor medio de cultivo para la inducción, fueron los compuestos orgánicos, ya que la parte inorgánica elegida fue la combinación mineral Y3 de Eeuwens (1976). Los compuestos orgánicos seleccionados para este estudio fueron los compuestos orgánicos Y3 de Eeuwens (1977), vitaminas Kao y Michayluk (KAO), Coctel 20 y sus combinaciones (Y3- KAO, Y3-C20 y KAO-C20). Estos medios se eligieron por experiencias con experimentos previos en cuanto a control de oxidación y respuesta embriogénica.

La respuesta de los medios estudiados fue muy clara en cuanto a la respuesta y control de la oxidación, obteniendo como mejores medios aquellos que sólo contenían los compuestos orgánicos Y3 y por otro lado aquel que sólo contenía el Coctel 20. Esto debido principalmente a la presencia de concentraciones adecuadas de nitrógeno reducido, el cual parece ser esencial para un desarrollo satisfactorio de tejido *in vitro* de coco (Eeuwens, 1976). Además no es casualidad que ambos de estos compuestos orgánicos contengan aminoácidos predominantes del agua de coco como glutamina, ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico, alanina y arginina. El resto de compuestos orgánicos (pyridoxina y ácido nicotínico) parecen no tener un efecto en el crecimiento y desarrollo de los tejidos del coco, salvo la tiamina y el meso-inositol durante prolongados periodos de cultivo (Eeuwens, 1977).

Con base en lo anterior, se seleccionó a los medios C-Y3 y C-C20 como los mejores medios de cultivo respecto al control de la oxidación, proliferación de callo embriogénico y desarrollo de embriones somáticos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas no tanto en tiempo de respuesta, sino más bien en el tipo de callo embriogénico y embriones somáticos que se desarrollaron en cada medio. Mientras que en el tratamiento

C-Y3 se formaba un callo de forma regular, consistencia dura y bajo número de embriones somáticos individualizados y de tipo torpedo, en el tratamiento C-C20 se observaron callos de forma irregular, de consistencia suave que desarrollaban mayor número de estructuras embrionarias globulares.

Evaluación del rendimiento por tipo de segmento

Muy pocos autores han hecho relevantes la evaluación de rendimientos en sus resultados, la mayoría solo maneja porcentajes de callo embriogénico y algunos mencionan aisladamente un promedio de embriones somáticos por explante. De los trabajos consultados en esta tesis, solo Perez-Nuñez y colaboradores (2006) han analizado sus rendimientos tanto en una embriogénesis primaria como en secundaria; sus resultados en la embriogénesis somática comparados con los nuestros se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Comparación de rendimientos reportados. En el cuadro se observa la diferencia de rendimientos entre nuestro protocolo, el cual permite obtener mayor porcentaje de callo embriogénico y mayor número de embriones somáticos por explante en menor tiempo y el de Perez-Nunez et al., 2006.

Pérez- Núñez <i>et al.</i> , 2006			Ramírez y Olivera		
% Callo embriogénico	Promedio de embriones somáticos por explante (<i>Plúmula</i>)	Días	% Callo embriogénico C-Y3 C-C20	Promedio de embriones somáticos por explante (<i>Segmentos de embrión</i>)	Días
38 %	5.16	130	90%	6.1	60
			71%	9	60

Aunque en la primera embriogénesis nosotros obtuvimos mejores rendimientos, Pérez-Núñez y colaboradores al realizar embriogénesis secundarias calcularon hasta 98 000 embriones somáticos por plúmula aumentando sus rendimientos hasta un 42% de callo embriogénico y 6.33 embriones somáticos por explante.

Es importante mencionar que no solo se trata de tener un gran número de embriones somáticos, si no también que sean capaces de germinar y crecer. Sin embargo el hecho de que se puedan obtener un gran número de embriones somáticos permite tener material biológico para estudiar tanto nivel estructural como hacer pruebas de germinaciones con distintos medios.

Estos resultados representan una buena base para la construcción de un protocolo reproducible y rentable para la micropropagación *in vitro* de coco, pues a diferencia de

otros protocolos publicados, este ha logrado obtener un mayor porcentaje de callo embriogénico así como un mayor número promedio de embriones somáticos por explante en menor tiempo.

ETAPA II: ESTUDIO ESTRUCTURAL DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Las diferencias entre los medios de cultivo seleccionados así como la baja tasa de germinación (<5%) que presentaban las estructuras embrionarias al pasar a un medio de germinación dio pauta para realizar un estudio histológico que permitiera comprobar la presencia de embriones somáticos, para entender su origen y conocer las limitaciones para su germinación.

En el tratamiento C-Y3 se observó el desarrollo de estructuras embrionarias individualizadas, lo cual es un indicador de una vía unicelular de formación de embriones somáticos. En estas estructuras embrionarias todas presentaron una clara polaridad, sin embargo, no en todas desarrollaban meristemo apical, lo cual es una anomalía que inhibe la exitosa germinación de dichos embriones somáticos.

En cuanto al tratamiento C-C20, se observó la formación de estructuras globulares a partir de células meristemáticas provenientes de tejido provascular. Este desarrollo de centros meristemáticos es indicador de un desarrollo multicelular de embriones. Las anomalías más frecuentes en este tratamiento fueron la malformación de estructuras embrionarias, la fusión de estructuras y la falta de desarrollo del meristemo apical de las estructuras embrionarias.

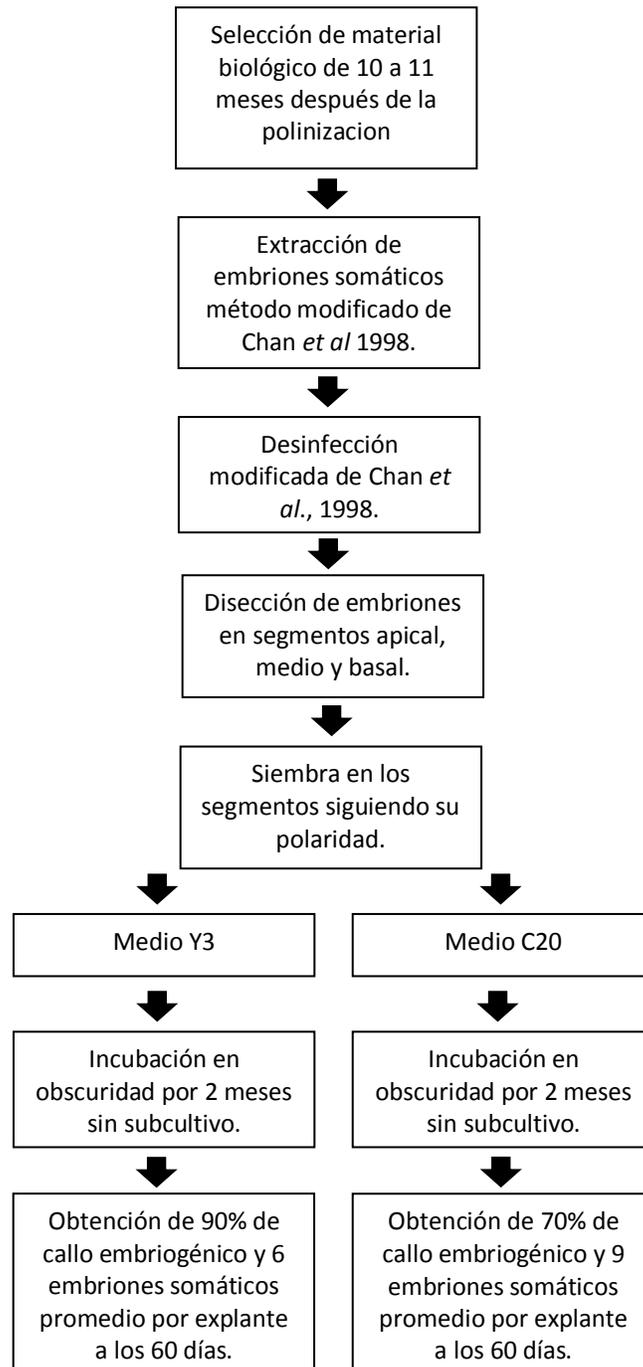
La mayoría de los embriones bien formados son capaces de germinar, mientras que aquellos con alguna aberración no germinan.

La secuencia de eventos que llevan a una germinación exitosa tanto embriones somáticos como cigóticos, son las siguientes:

- Individualización del protodermo
- Individualización de hebras provasculares
- Áreas meristemáticas que primero dan lugar al meristemo apical y más tarde al meristemo de raíz.

Por último, este estudio permitió tener una visión más amplia del proceso de embriogénesis somática en el coco, la cual puede ser útil para futuros estudios como buscar la relación entre la baja germinación de embriones somáticos con la ocurrencia de aberraciones en el desarrollo de los mismos; la cual podría estar asociado a las concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento usados, por ejemplo, se ha visto en otros estudios que el 2,4-D causa malformaciones en el desarrollo de embriones somáticos.

Diagrama de ruta critica propuesta en este trabajo



CONCLUSIONES

- El método descrito en este trabajo (modificado de Chan *et al.*, 1998) para el aislamiento de embriones cigóticos se destaca por su facilidad, practicidad y limpieza, además de que evita la pérdida de material biológico.
- El uso de soluciones antioxidantes durante la desinfección favoreció el control de oxidación de los explantes desinfectados.
- El método de desinfección modificado de Chan *et al.*, 1998 descrito en este trabajo, no sólo ha demostrado un 99% de establecimiento, sino que también una mejor respuesta debido a que presenta una menor oxidación.
- Los segmentos embrionarios como explante, han tenido una excelente respuesta ya que se utiliza menos material biológico, se reduce el tiempo de respuesta a callo embriogénico (60d) y produce mayor número de embriones somáticos por explante (6 a 9 ES por explante).
- El segmento embrionario medio y apical son los que mejores resultados presentan en los tratamientos CI-Y3 y CI-C20, ya que son los que mayor número de embriones somáticos promedio por explante presentan.
- El uso de sustancias antioxidantes en el medio mejoró el control de la oxidación en los tratamientos especialmente en el CI-Y3 y C-C20.
- El PVP en una concentración de 2.5g/L resultó ser muy efectivo en el control de oxidación, además de que no adsorbe el 2,4-D por lo que permite ser más eficientes en el uso de reguladores de crecimiento y en el control de la oxidación.
- El 2,4-D en una concentración de 0.2mg/L sin usar carbón activado resultó ser una concentración con muy buenos resultados para la inducción de callo embriogénico.
- La incubación de los cultivos en oscuridad redujo la oxidación de los cultivos y mejoró la respuesta.
- Los medios C-Y3 y C-C20 fueron los mejores medios de inducción de callo embriogénico por su buena respuesta y mínima oxidación.
- Se obtuvieron diversas imágenes de cortes histológicos que ayudaron a comprender mejor el proceso de embriogénesis en coco en los medios seleccionados.
- Se identificaron malformaciones y aberraciones comunes en los embriones somáticos que limitan su desarrollo y posterior germinación.
- Se identificó un posible origen unicelular en los embriones somáticos del tratamiento C-Y3, mientras que en los embriones somáticos del tratamiento C-C20 fue un origen multicelular.

PERSPECTIVAS

- Estudiar el origen de las aberraciones en el desarrollo de los embriones somáticos que limitan en gran parte su germinación. Esto podría estar asociado al uso del 2,4-D como regulador de crecimiento.
- Evaluar desarrollo y eficiencia de germinación de los embriones somáticos de los tratamientos más exitosos (C-Y3 y C-C20).
- Evaluar distintos medios y condiciones ambientales (luz y temperatura) para la germinación de embriones somáticos.
- Buscar la posibilidad de obtener una embriogénesis secundaria, en la cual se ha visto que el desarrollo y germinación de los embriones somáticos es mejor que la primaria.

REFERENCIAS

- Abdelwahd R., Hakam N., Labhilili M., Udupa S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in vitro plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002
- Alfonso J. y Ramírez T. 2008. Manual técnico del cocotero (*Cocos nucifera*). EDA. FHIA. FINTRAC. La Lima, Cortes, Honduras. 39p.
- Álvarez R. 1998. Apuntes de citología-histología de las plantas. Universidad de León. León.
- Álvarez R. 2002. Atlas de histología y organografía de las plantas. Universidad de León. León.
- Amiot M., Forget F., Goulpy P. 2006. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herbapolonica* 42:237-247.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20 (1):153-175
- Azpetia-Morales A., Chan J., Sáenz L. y Oropeza C. 2009. Influence of embryogenic callus subdivision on coconut somatic embryo formation. *Agricultura Técnica en México*. Vol. 35. Num.1. p 36-45.
- Blake J. y Hornung R. 1995. Somatic embryogenesis in coconut. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 327–349
- Branton R. y Blake J. 1986. In vitro plantlet development from colloid derived from immature inflorescence of *Cocos nucifera* L. In: Somers DA, Gengenbach BG, Biesboer DO, Hackett WP, Green CE (eds) *Abstracts of VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. University of Minnesota, Minneapolis, p 399
- Branton R. y Blake J. 1983a. A lovely clone of coconuts. *New Sci* 98:554–557
- Branton R. y Blake J. 1983b. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* (L.). *Ann Bot* 52:673–678
- Bray E., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stress. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland. USA. pp. 1158-1203.
- Buckley R., Harries H. 1984. Self-sown wildtype coconuts from Australia. *Biotropica*. 16(2): 148-151.
- Buffard-Morel J., Verdeil J., Pannetier C. 1988. Vegetative propagation of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) through somatic embryogenesis. In: Durand G, Bobichon L, Florent J (eds) *Proceedings of the 8th International Biotechnology Symposium*, Paris. Société Française de Microbiologie, Paris, p 177

- Chan E. y Elevitch C. 2006. *Cocos nucifera* (Coconut), ver. 2.1. In : Elevitch C. (ed.) Species Profile for Pacific Islands Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawaii. [Http://www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org).
- Chan L. J., Saénn, L., Talavera C., Hornung R., Robert M., Oropeza C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17:515-521.
- Chanatasig C. 2004. Inducción de la embriogenesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), conresistencia a enfermedades fúngicas. Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
- Corner E. 1966. The natural history of palms. Berkeley, CA: University of California Press. 393 p.
- Cortés F. 1985. Cuadernos de histología vegetal. Marvan. Madrid.
- Domínguez E., López-Arroyo J., Castillo-González R., Ruiz-Beltrán P. 1999. El cocotero *Cocos nucifera* L. Manual para la Producción en México. INIFAB.CIRGOC. Campo experimental huimanguillo. Libro técnico Num. 6. Tabasco, México. 132p.
- Dorris M. 2010. What is plant tissue culture. *Journal of the Bromeliad Society*. Jul/Aug2010, Vol. 60 Issue 4, p172-178. 7p.
- Eeuwens C. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiol Plant* 36:23–28
- Eeuwens C. 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *physiol. Plant*. 43:173-178
- Evert R. 2006. Easu's plant anatomy. John Wiley & Sons, Inc. Honoken, New Jersey.
- Fernando S. y Gamage C. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Sci*. 151: 193–198
- Fernando S., Verdeil J., Hocher V., Weerakoon L., Hirimburegama K. 2003. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72:281–284
- Ferreira E., Contin M., Yoshimitsu S., Quirino A., Carvalho M., Manfio C. 2008.
- Finch R., Baset A., Slamet I., Cocking E. 1992. In vitro shoot culture of wild *Oryza* and other grass species. *Plant cell, Tissue and organ culture* 30: 31- 39
- George E. 1993. Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology. 2ed. Exegetics Limited. England. 574p.

- Gomes-Pereira K., Carla de Olivera V., Da Silva-Ledo A., Da Silva Angelo P., Da Silva Costa J. 2004. INDUÇÃO DE CALO A PARTIR DE EIXO EMBRIONÁRIO DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.). Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP, Vol. 26, Num. 1, p 124 -126.
- Granados-Sánchez D. y López-Ríos G. 2002. Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, enero-junio, año/vol. 8, número 001. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 39- 48.
- Haccius B., Philip V. 1979. Embryo development in *Cocos nucifera* L.: a critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. Plant Syst. Evol. 132:91–106
- Harikrishnan K., Martin K., Anand P., Hariharan M. 1997. Micropropagation of sweetflag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. Journal of medicinal and Aromatic Plant Sciences 19: 427-429.
- Henderson A. 1988. Pollination biology of economically important palms. Advances in Economic Botany. 6: 36-41.
- Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius) Plant cell Tiss Organ Cult 95:175-184.
- Jambor-Benczur E., Nemenyi A., Szendrak E., Szafian Z. 1997. *In vitro* propagation of *Ailanthus alrissima* (swingle) Horticulture Science 29: 22-25
- Jimenez V. y Bangerth F. 2001. Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 37–46.
- Kanchanapoom K. y Domyoas P. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis Guineensis* Jacq) embryo culture. Science Asia. 25: 195-202.
- Karp G. 1998. Biología celular y molecular. Traducido por el Dr. J. Pérez. UNAM. Mc Graw-Hill, Interamericana. México, pp 746.
- Karunaratne S., Peiyapperuma K. 1989. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): callus proliferation and somatic embryogenesis. Plant Sci 62:247–253.
- Kiernan J. 2002. Histological and histochemical methods: theory and practice Arnold Publisher. (3ª edición). London.
- Loyola-Vargas V., De la Peña C., Ávalos R., Quiroz-Figueroa F. 2008. Plant tissue culture. Chapter 50. Plant cell culture, protein and cell method, biotech handbook. J. M. Walker and R. Rapley, editors, Humana Press, USA, Publisher p.875-904.
- Martínez M. 2011. Producción in vitro de taxanos de *Taxus globosa* Schlecht bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Merkle S., Parrott W., Flinn B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in: *in vitro* embryogenesis in plants T.A. Edit. Thorpe Kluwer Academic Publisher Netherlands. P.p 155-203
- Michaux-Ferriere N. y Carron M.1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 19:243–256.
- Muñoz T. 2003. Embriogénesis somatic en Cedro (*Cedrela Adorata Linnaeus*) a partir de cotiledones. Tesis de Licenciatura.
- Noctor G, y Foyer C. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: pp. 249–279.
- Opeke L. y Lawrence K. 1982. Tropical tree crops. Chichester, UK: John Wiley and Sons. 312 p.
- Padayatty S., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S., Levine M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22 (1): pp. 18 – 35.
- Parrota J. 1993. *Cocos nucifera* L. Coconut, coconut palm, palma de coco. SO-ITFSM-157. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 7 p.
- Perera L., Fernando W.,, Hearth N., Fernando A., Russell J., Provan J., Powell W. 2004. Use of microsatellite DNA markers for population analysis, variety identification and for hybridity testing of coconut in Sri Lanka. In: Peiris TSG, Ranasinghe CS (eds) Proceedings of the international conference to mark the 75th anniversary of Coconut Research Institute, Sri Lanka. Part II. Ceylon Printers, Colombo
- Perera L., Meegahakumbura M., Dissanayake H., Perera S. 2007. Development of crosses using exotic pollen. Annual report. Coconut Research Institute, Lunuwila
- Perera P., Hocher V., Verdeil J., Doulbeau S., Yakandawala D., Weerakoon L. K. 2007. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 26:21-28.
- Pérez-Núñez M., Chan J., Sáenz T., González J., Verdeil, Oropeza C. 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42:37-43.
- Perl A., Lotan O., Abu-Abied M., Holland D. 1996. Establishment of and *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotech.* 14:624-628.
- Pompeu G., Gratao P., Vitorello V., Azevedo R., 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel- induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola* 65: 548-552.

- Roca W. y Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de agricultura tropical. Cali, Colombia. P. xii, 970.
- Sáenz L., Azpeitia A., Chuc-Armendariz B., Chan J. L., Verdeil J., Hocher V., Oropeza C. 2006. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 42: 19-25.
- SAGARPA. 2005. Plan Rector Sistema Producto Nacional Palma de Coco. DOCUMENTO VALIDADO POR EL COMITÉ SISTEMA PRODUCTO PALMA DE COCO EN SESIÓN DEL 31 DE AGOSTO DE 2005.
- Sandoval-Zapotitla, Rojas E., Guzman C., Carmona L., Ponce R., Leon C., Loyola C., Vallejo M., Medina A. 2005. Tecnicas aplicadas al estudio de la Anatomia Vegetal. Cuadernos del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. 38: 278 pp.
- Santos-Ferreira J., Nunes-Warkick D., Siqueira L. 1998. A cultura do coqueiro no Brasil. Embrapa, 292 pp.
- Schwendiman J., Pannetier C., Michaux-Ferriere N. 1990. Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oleagineux* 45(10): 409–415.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010, Segunda Sección. México.
- Sharp W., Sondahl M., Caldas L., Maraffa S. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticul. Rev.* 2: 268–310.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53 (372): 1305 – 1319
- Shirke S., Kendurkar S., Apte A., Phadke C., Nadgauda R., Mascarenhas A. 1993. Regeneration in coconut tissue culture. In: Nair MK, Khan NH, Gopaldasundaram P, Bhaskara Rao EVV (eds) *Advances in coconut research and development*. Oxford and IBH, New Delhi, pp 597–604
- Tabyeh D., Bernanrd F., Shacker H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA effects on broening in pistacia vera shoot tips cultur. *Acta Horticulturae* 726:201-204.
- Taiz L. y Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*, fifth Ed. Sinauer Associates.

- Thomas P. y Ravindra M. 1997. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factor, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science* 72: 713-722.
- Universidad Autónoma de Chapingo, Secretaria de economía y unidad gestora de servicios tecnológicos. 2002. Estudio para dar valor agregado al cocotero (*Cocos nucifera* L.). Chapingo, México.
- Van Staden J., Fennell C., Taylor N. 2006. Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55 -62.
- Verdeil J. y Buffard-Morel J. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera*): In: Bajaj, Y.P.S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp 299 – 317.
- Verdeil J., Hocher V., Huet C., Grosdemange F., Escoute J., Ferriere N., Nicole N. 2001. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryonic competence. *Ann Bot* 88:9-18
- Verdeil J., Huet C., Grosdemange R., Buffard-Morel J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 13:218–221
- Vives E. A., Posse V., Oyarvide M.L. Pérez G., Medvedovsky D., Rothlin R. 2004. *Farmacología II, Antisépticos y desinfectantes*.
- Vives E., Posse V., Oyarvide M., Pérez G., Medvedovsky D., Rothlin R. 2004. *Farmacología II, antisépticos y desinfectantes*.
- Yang X., Zhang X. 2010. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Science*; 29:36-57.
- Zepeda C., Sagawa Y. 1981. *In vitro* propagation of pineapple. *Hort science* 16:495.

Páginas electrónicas

APCC.

www.apccec.org

Cocos nucifera.

[http://itp.lucidcentral.org/id/palms/sap/American Palm Cixiid.html](http://itp.lucidcentral.org/id/palms/sap/American_Palm_Cixiid.html)

Cocos nucifera.

www.traditionaltree.org

CONACOCO.

www.conacoco.com.mx

FAOSTAT.

www.faostat.fao.org

Gobierno del estado de Guerrero.

<http://guerrero.gob.mx/articulos/aprovechamiento-integral-de-la-palma-de-coco/>

Hipoclorito de sodio.

www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/seminarioesterilizacion

Microbiología e inmunología.

<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/>

Noticias la opinión.

<http://noticias.laopinion.com.mx/?p=5770>

SIAP.

http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15

Técnicas histológicas.

<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-proceso.php>

University of California Photo Database.

http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?where-taxon=Cocos+nucifera

López C y Perán R. 1997. Embriogénesis somática. Encuentros en la Biología, editada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

<http://www.encuentros.uma.es/encuentros39/embriogenesis.html>